



Inês Filipa Terraço de Figueiredo

Licenciada em Biotecnologia

**Identificação de alterações moleculares
envolvidas na progressão e desdiferenciação
dos carcinomas da tiróide**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Branca Maria Prudêncio Limón Cavaco, Investigadora
Principal, Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga

Arguente: Doutor António Medina de Almeida



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro 2012

Identificação de alterações moleculares envolvidas na progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tiróide

Copyright Inês Filipa Terraço de Figueiredo, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao terminar este trabalho gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para a sua realização:

À minha orientadora Doutora Branca Cavaco, pela excelente oportunidade de realizar este trabalho no laboratório de Endocrinologia Molecular da Unidade de Investigação de Patobiologia Molecular do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (UIPM/IPOLFG), proporcionando-me uma aprendizagem muito rica, fundamental para a minha evolução, tanto a nível pessoal, como, futuramente, a nível profissional. Um agradecimento especial por todo o apoio, simpatia, disponibilidade e incentivo demonstrados, imprescindíveis à concretização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor José Paulo Sampaio, coordenador de Mestrado, agradeço a oportunidade de ter frequentado este curso, e por todo o apoio e disponibilidade manifestados.

Ao Doutor Valeriano Leite, por todo o acompanhamento ao longo deste ano, pela sua simpatia e disponibilidade.

Ao colega de grupo Jaime Pita, por toda a ajuda indispensável para a realização deste trabalho. Pela sua simpatia e boa disposição contagiantes, e por todo o acompanhamento e disponibilidade.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e ao Serviço de Anatomia Patológica do IPOLFG, pela disponibilidade e colaboração na cedência das amostras.

Ao Dr. Filipe Pinto, pela disponibilidade e apoio no tratamento estatístico dos resultados obtidos neste trabalho.

Às colegas de grupo, Ana Luísa Silva, Margarida Moura, Rita Domingues e Joana Pereira por todo o apoio e amizade ao longo deste ano. A sua simpatia, boa disposição, disponibilidade e ajuda foram contributos essenciais ao longo deste ano. E também à ex-colega de grupo Rute Tomaz, pela sua paciência, simpatia e ajuda no início deste trabalho.

Aos restantes membros do UIPM, que de alguma contribuíram para a concretização deste trabalho. Em especial à Sofia Fragoso e às “LHO’s” por toda a simpatia, disponibilidade e apoio ao longo deste ano.

A todos os meus amigos, por todo o apoio, não só ao longo deste ano, mas durante todo o percurso. Felizmente, a lista é extensa e difícil de enumerar sem esquecer alguém, mas estas pessoas sabem quem são. Obrigada por todos os momentos, tanto de trabalho, como de convívio. Obrigada por terem tornado este caminho bastante mais agradável e fácil de percorrer. Um agradecimento especial às meninas do 58, por terem partilhado comigo a vida em Lisboa durante este ano. Por o terem tornado um ano com óptimas recordações e por todo o apoio, amizade e paciência indispensáveis.

Ao Pedro, que foi, durante os últimos 7 anos da minha vida, mais do que um namorado, um verdadeiro amigo, com o qual pude contar em todos os momentos, bons ou maus. Por todos os conselhos e apoio durante toda a minha vida académica, indispensáveis para o seu sucesso.

À minha família, e especialmente aos meus pais, quero agradecer todo o acompanhamento, incentivo, confiança, paciência e compreensão demonstrados ao longo da minha vida académica. Pelo constante e incondicional apoio, e por todos os conselhos e ensinamentos ao longo da vida, todos eles indispensáveis no futuro.

Resumo

Os carcinomas pouco diferenciados (PDTC) e anaplásicos (ATC) da tiróide são tumores muito agressivos, para os quais não existe actualmente uma forma de tratamento eficaz. Neste sentido, é importante identificar os mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento destes tumores. Em estudos dos perfis de expressão génica globais, realizados pelo nosso grupo, foram identificadas assinaturas moleculares comuns em PDTC e ATC, relacionadas com a proliferação celular, ciclo celular, adesão celular e metastização.

Com o objectivo de identificar alvos terapêuticos para PDTC e ATC, pesquisaram-se mutações em genes relacionados com as assinaturas moleculares identificadas (*TP53*, *CTNNB1*, *AXIN1*, *PIK3CA*, *N-H* e *K-RAS*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN1A*, *CDKN1B*) numa série de 49 tumores primários da tiróide (26 ATC e 23 PDTC) e em 6 linhas celulares (2 PDTC e 4 ATC). Analisaram-se também os níveis de expressão de um gene envolvido na invasão/metastização (*SNAI2*).

Nos tumores primários, identificaram-se mutações nos genes *BRAF* (PDTC=4%; ATC=4%), *RAS* (PDTC=14%; ATC=31%), *TP53* (PDTC=22%; ATC=42%), *PIK3CA* (PDTC=13%; ATC=4%), *CTNNB1* (PDTC=5%; ATC=0%), *CDKN2A* (PDTC=15%; ATC=5%), *CDKN2B* (PDTC=10%; ATC=0%) e *CDKN2C* (PDTC=0%; ATC=6%). Este estudo mostrou que os genes *TP53* e *RAS* apresentavam as mutações mais frequentes em PDTC e ATC. As mutações no gene *TP53* e as mutações nos genes *RAS* ou *BRAF*, apresentaram evidências de mútua exclusividade ($P=0,0193$). A presença de mutações nestes genes estava associada a um menor tempo de sobrevivência global dos doentes com PDTC e ATC ($P=0,0222$). Observou-se ainda que a sobre-expressão do gene *SNAI2* estava associada ao desenvolvimento de um subgrupo de ATC.

Os resultados do estudo das alterações moleculares na série de PDTC e ATC, confirmaram o envolvimento dos genes *BRAF*, *RAS*, *TP53* e *PIK3CA* e revelaram a contribuição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*) e invasão/metastização (*SNAI2*). Estes genes poderão representar alvos para intervenção terapêutica com impacto no seguimento clínico e sobrevivência destes doentes.

Palavras-Chave: tiróide, cancro, ATC, PDTC, mutações, alvos terapêuticos.

Abstract

Poorly differentiated (PDTC) and anaplastic (ATC) thyroid carcinomas are usually very aggressive tumours, for which, presently, there is no effective treatment. Therefore, it is important to identify the molecular mechanisms responsible for the development of these tumours. Studies of the genome-wide gene expression profiles, developed by our group, identified molecular signatures common to PDTC and ATC, which were related to cellular proliferation, cell cycle, cell adhesion, and metastasis.

In order to identify therapeutic targets for PDTC and ATC, we analysed 49 thyroid tumours (23 PDTC and 26 ATC) and 6 cell lines (2 PDTC and 4 ATC) for mutations in genes related to the molecular signatures previously identified (*TP53*, *CTNNB1*, *AXIN1*, *PIK3CA*, *N- H- e K-RAS*, *BRAF*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN1A*, *CDKN1B*). We also analysed the expression levels of one gene involved in invasion/metastasis (*SNAI2*).

In the primary tumours, we identified mutations in the following genes: *BRAF* (PDTC=4%; ATC=4%), *RAS* (PDTC=14%; ATC=31%), *TP53* (PDTC=22%; ATC=42%), *PIK3CA* (PDTC=13%; ATC=4%), *CTNNB1* (PDTC=5%; ATC=0%), *CDKN2A* (PDTC=15%; ATC=5%), *CDKN2B* (PDTC=10%; ATC=0%) and *CDKN2C* (PDTC=0%; ATC=6%). This analysis showed that the *TP53* and *RAS* genes presented the most frequent mutations in PDTC and ATC. Mutations in the *TP53* gene and mutations in *RAS* or *BRAF* genes showed evidence of mutual exclusivity ($P=0,0193$). The presence of mutations in these genes was associated with a decreased overall survival of the patients with PDTC and ATC ($P=0,0222$). Furthermore, we observed that the overexpression of *SNAI2* was associated with the development of an ATC subgroup.

The results of molecular analysis in the PDTC and ATC series, confirmed the involvement of the *BRAF*, *RAS*, *TP53* and *PIK3CA* genes, and revealed the contribution of genes that participate in cell cycle regulation (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*), and invasion/metastasis (*SNAI2*). These genes may represent useful targets for therapeutic intervention with impact in the clinical management and survival of these patients.

Keywords: thyroid, cancer, ATC, PDTC, mutations, therapeutic targets.

Índice Geral

Agradecimentos.....	V
Resumo	VII
Abstract.....	IX
Índice Geral	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XV
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	XVII
 I. Introdução	 1
1. Tumorigénese e progressão tumoral.....	1
2. A glândula tiroideia	3
3. Neoplasias da Tiróide	4
3.1. Neoplasias derivadas do epitélio folicular da tiróide (NMTC)	4
3.1.1. Carcinomas Bem Diferenciados da Tiróide (WDTC)	5
3.1.2. Carcinomas Pouco Diferenciados da Tiróide (PDTC).....	5
3.1.3. Carcinomas Anaplásicos ou Indiferenciados da Tiróide (ATC)	6
4. Modelo de progressão dos carcinomas da tiróide.....	7
5. Estudo dos perfis de expressão génica globais nos tumores da tiróide	8
5.1. Assinaturas moleculares de PDTC e ATC	8
5.1.1. Ciclo celular e proliferação celular	9
5.1.1.1. Inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs).....	9
5.1.1.2. O gene supressor de tumor <i>TP53</i>	12
5.1.1.3. A via de sinalização das MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) – ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase).....	14
5.1.1.4. A via de sinalização PI3K (<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>)/Akt	15
5.1.2. Adesão celular, transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) e metastização	17
5.1.2.1. A via de sinalização Wnt.....	17
5.1.2.1.1. O gene <i>CTNNB1</i> e o gene <i>AXIN1</i>	18
5.1.2.2. A via de sinalização do TGF- β	19
6. Tratamento das neoplasias da Tiróide	21
7. Objectivos	22
 II. Materiais e Métodos	 23
1. Amostras biológicas.....	23
2. Extracção de DNA a partir de tecido fresco	25
3. Extracção de DNA a partir de citologias aspirativas com agulha fina (<i>Fine Needle Aspiration Biopsy</i> , ou FNAB)	25
4. Extracção de DNA a partir de tecidos conservados em parafina.....	26
5. Extracção de RNA a partir de tecido fresco	27
6. Extracção de RNA a partir de FNAB	28
7. Quantificação espectrofotométrica de DNA e RNA.....	28

8. Síntese de cDNA por transcrição reversa de RNA	29
9. Amplificação de DNA/cDNA por PCR/RT-PCR.....	29
10. PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	31
11. Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose	33
12. Sequenciação automática.....	34
12.1. Purificação directa dos produtos de PCR	35
12.2. Purificação de bandas excisadas de gel de agarose.....	35
12.3. Reacções de sequenciação	36
12.4. Precipitação dos produtos da reacção de sequenciação.....	36
12.5. Electroforese capilar dos produtos de PCR	36
12.5.1. Análise de sequências.....	37
12.5.2. Análise do efeito funcional das variantes identificadas.....	37
13. Análise estatística	38
III. Resultados.....	39
1. Aspectos clínico-patológicos dos doentes	39
2. Selecção de genes candidatos para o desenvolvimento de PDTC e ATC	42
3. Identificação de alterações genéticas	42
3.1. Mutações	43
3.1.1. <i>BRAF</i>	43
3.1.2. <i>N-, H- e K-RAS</i>	44
3.1.3. <i>TP53</i>	45
3.1.4. <i>PIK3CA</i>	46
3.1.5. <i>CTNNB1</i>	47
3.1.6. <i>AXIN1</i>	47
3.1.7. <i>CDKN2A</i>	48
3.1.8. <i>CDKN2B</i>	48
3.1.9. <i>CDKN2C</i>	49
3.1.10. <i>CDKN1A</i>	49
3.1.11. <i>CDKN1B</i>	49
3.2. Polimorfismos	50
4. Estudo quantitativo dos níveis de expressão do gene <i>SNAI2</i>	51
5. Alterações identificadas na sequência e expressão dos genes analisados na série de PDTC e ATC	52
6. Correlação entre as alterações genéticas identificadas em PDTC e ATC e o diagnóstico histológico	55
7. Correlação entre as alterações genéticas identificadas em PDTC e ATC.....	56
8. Correlação entre alterações genéticas e aspectos clínico-patológicos dos doentes com PDTC e ATC	57
IV. Discussão	61
V. Bibliografia	75
VI. Anexos	83

Índice de Figuras

Figura I.1 -	Dez características das células tumorais propostas por Hannah e Weinberg.....	2
Figura I.2 -	Localização da glândula tiroideia.....	3
Figura I.3 -	Classificação dos carcinomas da tiróide derivados de células foliculares.....	5
Figura I.4 -	Representação esquemática da progressão dos carcinomas da tiróide.....	8
Figura I.5 -	O ciclo celular e os respectivos <i>checkpoints</i>	9
Figura I.6 -	p53 e o seu mecanismo de supressão tumoral.....	12
Figura I.7 -	Mecanismo de acção da p53 <i>wt</i> versus p53 <i>mut</i>	13
Figura I.8 -	As vias de sinalização PI3K/Akt e MAPK-ERK.....	16
Figura I.9 -	A composição do complexo de destruição da β -catenina.....	18
Figura I.10 -	A via de sinalização do TGF- β na maioria das células.....	20
Figura I.11 -	Mecanismo de inactivação da TAp63.....	20
Figura II.1 -	Amplificação com sondas <i>Taqman</i> ®.....	31
Figura II.2 -	Sequenciação de DNA por electroforese capilar.....	34
Figura III.1 -	Curvas de sobrevivência dos doentes com ATC e PDTC.....	41
Figura III.2 -	Sequenciação do exão 3 do gene <i>N-RAS</i> numa amostra com sequência <i>wt</i> e numa amostra com a mutação c.182A>G.....	45
Figura III.3 -	Sequenciação do exão 7 do gene <i>TP53</i> numa amostra com sequência <i>wt</i> e numa amostra com a mutação c.743G>A.....	46
Figura III.4 -	Expressão relativa do gene <i>SNAI2</i> nos diferentes histotipos.....	51
Figura III.5 -	Curvas de sobrevivência dos doentes com PDTC e ATC com <i>TP53 mut</i> vs <i>TP53 wt</i> e <i>RAS wt</i> e <i>BRAF wt</i>	57
Figura III.6 -	Curvas de sobrevivência dos doentes com PDTC e ATC com <i>RAS mut</i> ou <i>BRAF mut</i> vs <i>TP53 wt</i> e <i>RAS wt</i> e <i>BRAF wt</i>	57
Figura III.7 -	Curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC, com <i>TP53 mut</i> e/ou <i>RAS mut</i> ou <i>BRAF mut</i> vs <i>RAS wt</i> e <i>BRAF wt</i>	58
Figura III.8 -	Curvas de sobrevivência dos doentes com PDTC ou ATC com 0 mutações vs 1 ou mais mutações.....	59
Figura IV.1 -	Localização das mutações identificadas no gene <i>BRAF</i>	62
Figura IV.2 -	Localização das mutações identificadas nos genes <i>N-</i> e <i>H-RAS</i>	63
Figura IV.3 -	Localização das mutações identificadas no gene <i>TP53</i>	65
Figura IV.4 -	Localização das mutações identificadas no gene <i>PIK3CA</i>	66
Figura IV.5 -	Localização da mutação identificada no gene <i>CTNNB1</i>	67
Figura IV.6 -	Localização das variantes identificadas no gene <i>AXIN1</i>	67
Figura IV.7 -	Localização das mutações identificadas no gene <i>CDKN2A</i>	69
Figura IV.8 -	Localização das mutações/variantes identificadas no gene <i>CDKN2B</i>	69
Figura IV.9 -	Localização da mutação identificada no gene <i>CDKN2C</i>	69

Figura IV.10 - Representação esquemática dos resultados obtidos neste trabalho relativamente aos genes envolvidos no desenvolvimento de PDTC e ATC..... 71

Índice de Tabelas

Tabela III.1 -	Aspectos clínico-patológicos dos doentes com PDTC e ATC.....	39
Tabela III.2 -	Correlação entre os aspectos clínicos e histopatológicos e o diagnóstico PDTC vs ATC.....	41
Tabela III.3 -	Mutações identificadas no gene <i>BRAF</i> em PDTC e ATC.....	43
Tabela III.4 -	Mutações identificadas no gene <i>N-RAS</i> em PDTC e ATC.....	44
Tabela III.5 -	Mutações identificadas no gene <i>H-RAS</i> em PDTC e ATC.....	44
Tabela III.6 -	Mutações identificadas no gene <i>TP53</i> em PDTC e ATC.....	45
Tabela III.7 -	Mutações identificadas no gene <i>PIK3CA</i> em PDTC e ATC.....	46
Tabela III.8 -	Mutações identificadas no gene <i>CTNNB1</i> em PDTC e ATC.....	47
Tabela III.9 -	Variantes identificadas no gene <i>AXIN1</i> em PDTC e ATC.....	47
Tabela III.10 -	Mutações/variantes identificadas no gene <i>CDKN2A</i> em PDTC e ATC.....	48
Tabela III.11 -	Mutações/variantes identificadas no gene <i>CDKN2B</i> em PDTC e ATC.....	48
Tabela III.12 -	Mutações identificadas no gene <i>CDKN2C</i> em PDTC e ATC.....	49
Tabela III.13 -	Polimorfismos identificados nas amostras de tumores primários e linhas celulares de PDTC e ATC.....	50
Tabela III.14 -	Alterações identificadas na sequência e expressão dos diferentes genes analisados na série de PDTC e ATC.....	52
Tabela III.15 -	Frequência de mutações nos diferentes genes e sobre-expressão do gene <i>SNAI2</i> identificadas na série de PDTC e ATC.....	54
Tabela III.16 -	Correlação entre as mutações e sobre-expressão identificadas e o diagnóstico histológico.....	55
Tabela III.17 -	Correlação entre as mutações nos genes <i>RAS</i> e <i>TP53</i> em PDTC e ATC.....	56
Tabela III.18 -	Correlação entre as mutações nos genes <i>BRAF</i> ou <i>RAS</i> e <i>TP53</i> em PDTC e ATC.....	56
Tabela III.19 -	Correlação entre o número de mutações em cada tumor e a idade dos doentes com PDTC e ATC à data do diagnóstico.....	59

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

A	Resíduo de nucleótido contendo como base a adenina
aa.	Resíduo/s de aminoácido
Ala ou A	Resíduo de aminoácido alanina
ANOVA	Análise de variância (<i>Analysis of Variance</i>)
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARF	<i>Alternate Reading Frame</i>
ARM	Repetições <i>Armadillo</i>
Asn ou N	Resíduo de aminoácido asparagina
Asp ou D	Resíduo de aminoácido aspartato
ATC	Carcinoma anaplásico da tireóide (<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>)
AXIN1	<i>AXin INhibitor 1</i>
BD	Domínio de ligação (<i>Binding Domain</i>)
bp	Número de pares de resíduo de nucleótidos (<i>base pairs</i>)
BRAF	<i>Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i>
C	Resíduo de nucleótido contendo como base a citosina
C1	Domínio rico em resíduos de cisteína
C2	Domínio de ligação a Ca^{2+}
CDK	Cinase dependente de Ciclinas (<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>)
CDKN-	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor-</i>
cDNA	DNA complementar (do mRNA) <i>complementary DNA</i>
CGH	Hibridação Genômica Comparativa (<i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CIP/KIP	<i>CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein</i>
CK1	<i>Casein Kinase 1</i>
CKI	Inibidores de cinases dependentes de ciclinas codificados pelos genes <i>CDKN-</i>
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations In Cancer</i>
cPTC	Carcinoma papilar da tireóide clássico (<i>classic Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
Ct	Ciclo de <i>threshold</i> (<i>threshold cycle</i>)
CTD	Domínio de regulação da região terminal-C (<i>C-Terminal regulation Domain</i>)
CTNNB1	<i>Catenin beta 1</i>
Da	Dalton
DAX	Domínio presente nas proteínas Dvl e Axina-1
db	Base de dados (<i>database</i>)
DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA-Binding Domain</i>)
ddNTP	Didesoxinucleótido (<i>dideoxynucleotide</i>)
del	Delecção
DEPC	Dietilpirocarbonato (<i>diethylpyrocarbonate</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxinucleótido (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DTT	Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>)
Dvl	<i>Dishevelled</i>
E-	Exão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Transição epitélio-mesenquimatosa (<i>Epithelial Mensenchymal Transition</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

FAM	6-carboxi-fluoresceína
FNAB	Citologia aspirativa de agulha fina (<i>Fine-Needle Aspiration Biopsy</i>)
fs	<i>Frameshift</i>
FTA	Adenoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Adenoma</i>)
FTC	Carcinoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>)
fvPTC	Carcinoma papilar da tiróide de variante folicular (<i>follicular variant of Pappillary Thyroid Carcinoma</i>)
FZD	<i>Frizzled</i>
g	Grama
G	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanina
Gln ou Q	Resíduo de aminoácido glutamina
Glu ou E	Resíduo de aminoácido glutamato
Gly ou G	Resíduo de aminoácido glicina
GOF	Ganho de capacidades oncogénicas (<i>Gain of Oncogenic Functions</i>)
GSK-3	<i>Glycogen Sythase Kinase-3</i>
GTP	Guanosina-5'-Trifosfato (<i>Guanosine-5'-TriPhosphate</i>
H₂O	Água
His ou H	Resíduo de aminoácido histidina
IHC	Imuno-histoquímica (<i>Immunohistochemistry</i>)
Ile ou I	Resíduo de aminoácido isoleucina
INK	<i>INhibitors of CDK</i>
ins	Inserção
IPOLFG	Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
k-	Kilo-
KD	Domínio de cinase (<i>Kinase Domain</i>)
Leu ou L	Resíduo de aminoácido leucina
LOF	Perda de capacidades anti-tumorigénicas (<i>Loss of Function</i>)
LOH	Perda de heterozigotia (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LRP5/6	<i>Low-density Lipoprotein-Related Protein 5/6</i>
LTBP1	<i>Latent TGF-beta Binding Protein 1</i>
Lys ou K	Resíduo de aminoácido lisina
M	Molar
m-	Mili-
MAPK	Cascata mitogénica activada por proteínas cinase (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
Mdm2	<i>Murine Double Minute 2</i>
ME	Mercaptoetanol
MEN	Neoplasia endócrina múltipla (<i>Multiple Endocrine Neoplasia</i>)
Met ou M	Resíduo de aminoácido metionina
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min.	Minuto
miR	microRNA
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
mRNA	RNA mensageiro (mRNA)
MTC	Carcinoma medular da tiróide (<i>Medullary Thyroid Carcinoma</i>)
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
mut	Forma mutada de um gene ou proteína (<i>mutant</i>)
Myc	<i>Avian Myelocytomatosis viral oncogene homolog (v-myc)</i>
n-	Nano-

n.d.	Informação não disponível
n.e.	Não estudado
NEG	Amostra sem alteração em determinado gene
NFQ	<i>Non-Fluorescent Quencher</i>
nm	nanómetro
NMTC	Carcinoma não-medular da tiróide (<i>Non-Medullary Thyroid Carcinoma</i>)
NTC	Controlo negativo, sem cDNA (<i>Non-Template Control</i>)
°C	Grau centígrado
p	Braço curto do cromossoma
P	<i>P-value</i>
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDK	<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase</i>
PDTC	Carcinoma pouco diferenciado da tiróide (<i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
Phe ou F	Resíduo de aminoácido fenilalanina
PI3K-α	Proteína codificada pelo gene <i>PIK3CA</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Alpha</i>
PIP	<i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
pmol	Picomol
POS	Amostra com alteração em determinado gene
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>
PRD	Domínio rico em resíduos de prolina (<i>Proline Rich Domain</i>)
Pro ou P	Resíduo de aminoácido prolina
PTC	Carcinoma papilar da tiróide (<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN</i>
q	Braço longo do cromossoma
R ou Arg	Resíduo de aminoácido arginina
RAS	<i>RAt Sarcoma virus homolog</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RBD	Domínio de ligação à proteína Ras
Ref^a	Referência
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RGD	Domínio de regulação da sinalização da proteína G
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RTK	Receptores do tipo tirosina cinase (<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>)
RT-PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase após transcrição reversa (<i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i>)
Ser ou S	Resíduo de aminoácido Serina
SNAI2	<i>Slug Chicken homolog</i>
SNP	Polimorfismo de nucleótido simples (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
T	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TA	Transactivação
TAD	Domínio de Transactivação (<i>Transactivation Domain</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borato-EDTA
TG	Tiroglobulina
TGFBR	<i>TGF-beta Receptor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
Thr ou T	Resíduo de aminoácido treonina
TP53	<i>Tumour Protein 53</i>
Trp ou W	Resíduo de aminoácido triptofano
TSH	Tirotropina ou hormona estimuladora da tiróide (<i>Thyroid-stimulationg hormone</i>)
TSHR	Receptor da hormona TSH
Tyr ou Y	Resíduo de aminoácido tirosina
US	Local de ubiquitinação (<i>Ubiquitination Site</i>)
UTR	Região não traduzida (<i>UnTranslated Region</i>)
UV	Ultravioleta
V ou Val	Resíduo de aminoácido valina
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
WAF1	<i>Wildtype p53-Activated Fragment 1</i>
WDTC	Carcinoma da tiróide bem diferenciado (<i>Well Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)
Wnt	<i>WiNgless-Type MMTV integration site family</i>
wt	Forma não mutada de um gene ou proteína (<i>wild type</i>)
X	Codão Stop
4D	Domínio de tetramerização (<i>Tetramerization Domain</i>)
λ	Comprimento de onda (nm)
μ-	Micro-
% (p/v)	Percentagem expressa em peso por volume
% (v/v)	Percentagem expressa em volume por volume

I. Introdução

1. Tumorigénese e progressão tumoral

O processo de tumorigénese envolve a acumulação de alterações genéticas que conduzem à transformação de uma célula normal numa célula neoplásica. Apesar da heterogeneidade dos vários tipos de cancro no que respeita às características clínicas, histológicas e moleculares, os processos moleculares básicos envolvidos na tumorigénese são muito semelhantes (Hanahan e Weinberg, 2000).

Quando uma célula normal sofre uma mutação que comprometa a homeostase celular, são activados mecanismos moleculares de protecção, para evitar que essa célula se torne potencialmente maligna. Estes mecanismos protectores envolvem sinais recebidos pela célula que sofre a mutação, que indicam a necessidade de transcrição de genes envolvidos na inibição da tumorigénese – inibição da proliferação celular, reparação de danos no DNA e, quando necessário, apoptose (Weinberg, 1996). Na maioria dos casos esta protecção é eficaz, e essa é a razão pela qual o cancro não é mais frequente. No entanto, por vezes há células que ultrapassam estes mecanismos de protecção, o que torna a célula potencialmente maligna. A subsequente acumulação de mutações em genes específicos pode conduzir à génese tumoral (Salk *et al.*, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011).

Existem dois grupos de genes que estão mais frequentemente associados à tumorigénese: os genes supressores de tumor e os oncogenes (Weinberg, 1994). Os genes supressores de tumor têm como função principal a inibição da proliferação celular, pelo que a sua inactivação é necessária para o desenvolvimento tumoral (Weinberg, 1994). Em 1971, Knudson postulou que estes genes são alvos de inactivação recessiva, ou seja, a inactivação de um dos alelos não é, normalmente, suficiente para que o gene perca a sua função de supressor tumoral. É necessário que ocorra a inactivação do segundo alelo, através de uma mutação inactivadora, de deleção (perda de heterozigotia; *loss of heterozygosity* - LOH) ou de mecanismos epigenéticos de hipermetilação do seu promotor (Knudson, 1971; Jones, 1996). Os oncogenes, por outro lado, promovem a proliferação celular de forma anómala. Estes genes têm origem em proto-oncogenes que sofrem mutações activadoras (Croce, 2008). Ao contrário dos genes supressores de tumor, os proto-oncogenes são activados de forma dominante, ou seja, é necessário que ocorra apenas mutação num dos alelos para que se transformem em oncogenes.

Outra classe de genes frequentemente envolvida na tumorigénese é constituída pelos genes responsáveis pela reparação de danos no DNA. A sua perda funcional origina uma resposta deficiente aos danos que ocorrem no DNA, o que leva a que os doentes portadores de mutações germinais em genes de reparação desenvolvam tumores com maior frequência (Weinberg, 1996; Hanahan e Weinberg, 2011).

Após os mecanismos de protecção da célula terem sido superados, as células tumorais necessitam de progredir. Para tal, adquirem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes de forma a acederem a vasos sanguíneos e linfáticos para a obtenção de nutrientes e oxigénio. Com esta nova capacidade, as células tumorais adquirem também competências para migrar para outros locais do organismo e assim formar as metástases (Weinberg, 1996).

Em 2000 e 2011 foram propostas por Hanahan e Weinberg dez características que todas as células tumorais vão adquirindo ao longo do processo multifásico da tumorigênese, e que as diferenciam das células normais (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011) (Figura I.1):

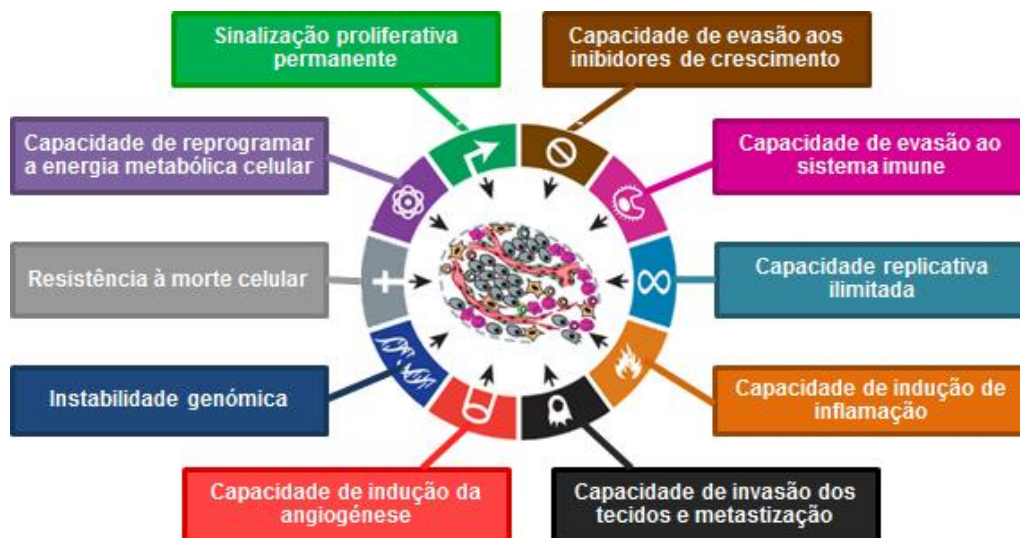


Figura I.1 - Dez características das células tumorais propostas por Hannah e Weinberg (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011)

- Sinalização proliferativa permanente, que provém de um descontrolo na produção e libertação de factores de crescimento. As proteínas B-Raf e PI3K- α , que, em cancro, se encontram frequentemente mutadas, em formas constitutivamente activas, constituem exemplos de sinais de proliferação permanente. As células tumorais passam a sustentar a sua própria proliferação, não dependendo de outros sinais;
- Capacidade de evasão aos inibidores de crescimento, que pode, por exemplo, resultar da inactivação dos genes supressores de tumor *TP53* e *RB1* que regulam a proliferação celular e senescência/apoptose. Outros reguladores do ciclo celular também têm um papel supressor tumoral, tais como os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs). A via de sinalização do TGF- β desempenha também este papel em fases iniciais da tumorigênese (Massague, 2008);
- Capacidade de evasão ao sistema imune que tem a capacidade de eliminar células tumorais;
- Capacidade replicativa ilimitada, devida à inactivação de supressores tumorais e à sobre-expressão da telomerase. Estes factores são essenciais para que as células consigam replicar-se permanentemente sem que haja o normal encurtamento dos telómeros dos cromossomas;
- Capacidade de invasão dos tecidos e metastização é necessária à sobrevivência das células tumorais. Existem vários mecanismos através dos quais as células tumorais adquirem esta capacidade. Uma das vias de sinalização chave é a via do TGF- β que, em fases mais avançadas da progressão tumoral passa a ter um papel pró-oncogénico e é crucial na indução da transição epitélio-mesenquimatosa (EMT), um processo essencial para que ocorra a invasão e metastização;
- Capacidade de indução da angiogênese é fundamental para que as células tumorais tenham acesso a nutrientes e oxigenação, necessários à sua sobrevivência e crescimento. O gene *VEGF-A*,

cuja expressão pode ser induzida por hipóxia e por sinalização oncogénica, constitui um dos exemplos de genes envolvidos na angiogénese tumoral.

- Resistência à morte celular, que nos tumores mais avançados e resistentes ocorre, frequentemente, por inactivação do supressor tumoral *TP53*. No entanto, outros mecanismos, como o aumento da expressão de factores anti-apoptóticos e diminuição da expressão dos genes pró-apoptóticos, são utilizados por estas células para ultrapassarem os mecanismos de protecção da célula contra a tumorigénese;

- Capacidade de reprogramar a energia metabólica da célula de modo a suportar as novas necessidades de constante crescimento e proliferação da célula tumoral, as quais diferem das células nos tecidos normais.

Hanahan e Weinberg (2011) propuseram ainda duas particularidades que as células tumorais possuem, e que lhes permitem adquirir as características atrás referidas:

- Instabilidade genómica que gera mutações aleatórias com elevada frequência;
- Capacidade de indução de inflamação que permite o recrutamento de moléculas importantes para o microambiente tumoral.

2. A glândula tiroideia

A glândula tiroideia é parte integrante do sistema endócrino e localiza-se na região cervical, junto à traqueia (Figura I.2). Esta glândula é composta por dois lobos unidos por um istmo, e é constituída maioritariamente por dois tipos de células epiteliais: as células foliculares, que constituem a maior parte do epitélio e envolvem os folículos, e as células parafoliculares, ou células C, que são granulares e rodeiam as células foliculares (Muro-Cacho e Ku, 2000; Kondo *et al.*, 2006). As principais funções da tiróide são a síntese, armazenamento e secreção de hormonas, que actuam na regulação do metabolismo e são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência dos vertebrados (Kondo *et al.*, 2006; Fagman e Nilsson, 2011).

As células foliculares da tiróide possuem um sistema de captação de iodo, através do simporte de sódio e iodo NIS (*Sodium/Iodide Symporter*), que é utilizado na síntese das hormonas tiroideias T3 (Triiodotironina) e T4 (Tetraiodotironina) (Farid *et al.*, 1994; De Felice e Di Lauro, 2004). A síntese destas hormonas dá-se após activação do receptor da TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone receptor* - TSHR), pela hormona TSH, que é secretada pela hipófise anterior. (Kondo *et al.*, 2006).

Nas células parafoliculares da tiróide é produzida a hormona calcitonina, que participa na regulação dos níveis de cálcio (De Felice e Di Lauro, 2004; Kondo *et al.*, 2006).

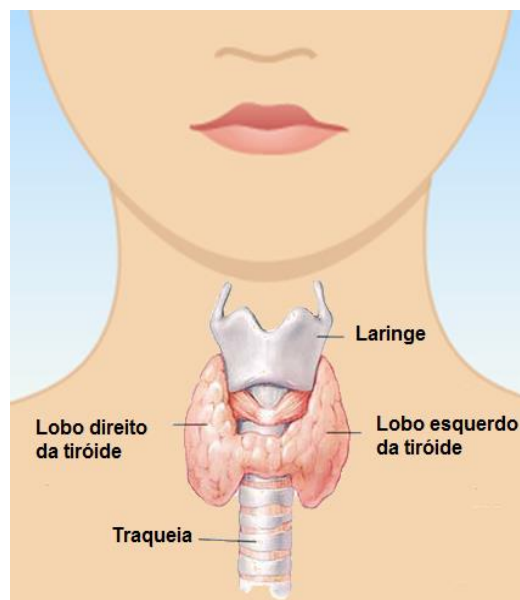


Figura I.2 - Localização da glândula tiroideia (Adaptado de www.abc.net.au e www.your-thyroid-guide.com).

3. Neoplasias da Tiróide

As neoplasias da tiróide representam cerca de 1% de todos os tumores em humanos (Farid *et al.*, 1994). São, no entanto, as neoplasias mais comuns do sistema endócrino (Kondo *et al.*, 2006; Legakis e Syrigos, 2011), e todos os anos surgem cerca de 122 mil novos casos a nível mundial (DeLellis *et al.*, 2004). A incidência de carcinomas da tiróide aumentou nas últimas décadas (Parkin, 2001; Parkin *et al.*, 2005; Jemal *et al.*, 2011), o que poderá resultar do efeito da radiação e/ou da maior sensibilidade do diagnóstico com a aplicação de novas tecnologias (Farid *et al.*, 1994).

Existem vários factores capazes de influenciar o aparecimento de cancro da tiróide. Entre estes encontram-se os factores ambientais, tais como a captação de iodo radioactivo que pode ter efeitos genotóxicos, ou a captação insuficiente de iodo, que promove a proliferação das células da tiróide como mecanismo compensatório (Kondo *et al.*, 2006). Alterações genéticas, a nível germinal ou somático, também têm um papel importante na carcinogénese da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004). Tem sido proposto que a maior incidência deste tipo de cancro em mulheres estará associada à presença de hormonas específicas (e.g. estrogénios) (Farid *et al.*, 1994; Kondo *et al.*, 2006).

A frequência dos diferentes histotipos das neoplasias da tiróide (ver secção I.3.1) varia de acordo com as idades, sendo que os histotipos menos agressivos são mais frequentes em adultos com idades compreendidas entre os 40 e os 50 anos, e os histotipos mais agressivos surgem normalmente após os 60 anos de idade (DeLellis *et al.*, 2004).

As neoplasias derivadas do epitélio da tiróide estão categorizadas de acordo com o tipo de células epiteliais nas quais têm origem. Os tumores derivados das células foliculares são designados por carcinomas não-medulares da tiróide (*Non-Medullary Thyroid Carcinoma* - NMTC), e os tumores com origem nas células parafoliculares, ou células C, são designados por carcinomas medulares da tiróide (*Medullary Thyroid Carcinoma* - MTC) (Muro-Cacho, 2000).

3.1. Neoplasias derivadas do epitélio folicular da tiróide (NMTC)

A maioria dos tumores da tiróide tem origem folicular (NMTC; > 95%) (DeLellis *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2006), e encontram-se classificados de acordo com a sua agressividade (Figura I.3). Os adenomas foliculares (*Follicular Thyroid Adenoma* - FTA) são tumores benignos. Entre os tumores malignos incluem-se: a) os carcinomas que apresentam diferenciação folicular evidente, que incluem os carcinomas foliculares (*Follicular Thyroid Carcinoma* - FTC) e os papilares (*Papillary Thyroid Carcinoma* - PTC); b) os carcinomas pouco diferenciados (*Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma* - PDTC); c) os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos (*Anaplastic Thyroid Cancer* - ATC) (DeLellis *et al.*, 2004). Nas secções seguintes serão descritas as características histológicas e moleculares dos diferentes tipos de carcinomas com origem no epitélio folicular da tiróide.

Tumores benignos	Carcinomas bem diferenciados (WDTC)	Carcinomas Pouco Diferenciados (PDTC)	Carcinomas Indiferenciados
<ul style="list-style-type: none"> • Adenoma Folicular (FTA) 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma Papilar (PTC) • Carcinoma Folicular (FTC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Histotipo intermédio entre WDTC e ATC 	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinomas Anaplásicos (ATC)
<ul style="list-style-type: none"> • Benignos 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouco agressivos • Mortalidade 3-6,5% 	<ul style="list-style-type: none"> • Agressivos • Mortalidade 3-50% 	<ul style="list-style-type: none"> • Muito agressivos • Mortalidade > 90%

Figura I.3 - Classificação dos carcinomas da tiróide derivados das células foliculares (Adaptado de Clark e Faquin, 2010).

3.1.1. Carcinomas Bem Diferenciados da Tiróide (WDTC)

Os PTC e FTC representam mais de 90% dos novos diagnósticos de neoplasias derivadas do epitélio folicular da tiróide, sendo os PTC cerca de 85% dos casos de carcinomas da tiróide (Kondo *et al.*, 2006). Estes dois tipos de neoplasias são caracterizados histologicamente por uma diferenciação folicular evidente (*Well Differentiated Thyroid Carcinomas* - WDTC) e têm, na maior parte dos casos, um prognóstico excelente, sendo que mais de 90% dos doentes com menos de 45 anos são tratados com sucesso (DeLellis *et al.*, 2004).

Histologicamente, os PTC são distinguidos dos FTC devido à disposição papilar das suas células, e à dilatação do núcleo, que possui forma oval e um aspecto “vazio” (DeLellis *et al.*, 2004; Lloyd *et al.*, 2011). Por outro lado, as células dos FTC apresentam morfologia variável, podendo conter folículos coloidais ou um padrão sólido ou trabecular (DeLellis *et al.*, 2004). Os PTC apresentam, por vezes, multifocalidade, e os FTC são geralmente unifocais (DeLellis *et al.*, 2004). Os PTC metastizam mais frequentemente para os gânglios linfáticos locais (PTC – 50%, FTC – 5%), e os FTC metastizam com maior frequência para locais distantes (FTC – 20%, PTC – 7%) (Kondo *et al.*, 2006).

Ao nível molecular, têm sido descritas diversas alterações responsáveis pelo aparecimento destes tumores. Entre estas, as vias das MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) parecem ter um papel importante, tendo sido descritas várias mutações ou rearranjos em genes que codificam proteínas envolvidas nesta via, nomeadamente mutações nos genes *RAS* e *BRAF* e rearranjos *RET-PTC* (Xing, 2005; Kondo *et al.*, 2006). Os rearranjos envolvendo os genes *PAX8* e *PPAR γ* também estão descritos como eventos iniciais nestes tumores (Kroll *et al.*, 2000). As mutações no gene *RAS* e o rearranjo *PAX8-PPAR γ* são eventos iniciais característicos dos FTC, enquanto que as mutações no gene *BRAF* e o rearranjo *RET-PTC* são característicos dos PTC (Kondo *et al.*, 2006).

3.1.2. Carcinomas Pouco Diferenciados da Tiróide (PDTC)

Os PDTC são um histotipo intermédio entre os WDTC e os ATC. A sua inclusão como entidade de diagnóstico dos tumores da tiróide tem sido controversa (Sadow e Faquin, 2012), sendo que apenas em 2004, esta classe de tumores foi introduzida na classificação da *World Health Organization* (WHO) *Classification of Endocrine Tumors* (DeLellis *et al.*, 2004).

Os PDTC foram classificados em 2004 como tumores que produzem tiroglobulina, e que apresentam algumas características dos tumores mais agressivos, como a necrose e um elevado número de mitoses. Possuem também padrões de crescimento insular, trabecular ou sólido, presentes na maior parte do tumor e que, normalmente, se encontram conjugados no mesmo tumor (Soares *et al.*, 2011). Os PDTC constituem cerca de 7% dos tumores derivados do epitélio folicular da tiróide e exibem evidências limitadas de diferenciação folicular (DeLellis *et al.*, 2004).

A taxa de mortalidade em doentes com este tipo de carcinomas é elevada nos três anos seguintes ao diagnóstico, e a taxa de sobrevivência acima dos cinco anos após o diagnóstico é reduzida. Neste tipo de carcinomas, a mortalidade ocorre preferencialmente devido à formação de metástases ósseas e pulmonares (DeLellis *et al.*, 2004).

A nível molecular, estas neoplasias também apresentam características intermédias entre os WDTC e os ATC. Genes que estão normalmente envolvidos no aparecimento de WDTC e ATC têm sido estudados em séries de PDTC. O gene *RAS*, preferencialmente *N-RAS* (codão 61), encontra-se mutado em cerca de 20% dos casos. O gene *BRAF* possui mutação apenas em casos de PDTC coexistentes com PTC, ou que derivaram destes (Soares *et al.*, 2011).

O gene *TP53* também se encontra mutado em PDTC (cerca de 26%) (Soares *et al.*, 2011). No entanto, a maioria dos estudos de pesquisa de mutações no gene *TP53* em PDTC foram realizados na década de 90 (Ito *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1996), quando ainda não havia concordância relativamente aos critérios de classificação dos PDTC, e como tal, estes valores poderão não estar totalmente correctos.

Os rearranjos que são frequentemente relacionados com o aparecimento de WDTC estão ausentes (*PAX8-PPAR γ*) ou presentes em baixa frequência (*RET-PTC*) em PDTC. Quando presentes, os rearranjos *RET-PTC* não se encontram associados a fenótipos mais agressivos (Soares *et al.*, 2011).

Nas secções seguintes será feita uma descrição mais detalhada sobre o estudo de mutações em PDTC.

3.1.3. Carcinomas Anaplásicos ou Indiferenciados da Tiróide (ATC)

Os ATC constituem uma das neoplasias mais agressivas em humanos. São tumores raros, tendo em conta que representam apenas 1 a 2% dos tumores da tiróide, mas são responsáveis por 14-39% das mortes devidas a cancro da tiróide (Taccaliti *et al.*, 2012). A taxa de mortalidade associada a estes tumores é muito elevada (> 90%), e a sobrevivência média é de apenas 6 meses após o diagnóstico (DeLellis *et al.*, 2004).

Estas neoplasias são caracterizadas por uma massa que cresce rapidamente na zona cervical, e que obstrui com frequência as vias respiratórias, sendo esta a causa de morte mais frequente em doentes com ATC (Soares *et al.*, 2011).

Histologicamente, estes tumores exibem na sua totalidade, ou quase totalidade, células indiferenciadas, com escassos indícios de uma origem folicular. Contêm áreas necróticas e hemorrágicas e células de morfologia variada (DeLellis *et al.*, 2004). Os ATC são, geralmente,

tumores não encapsulados e altamente invasivos dos tecidos adjacentes. As metástases pulmonares e ósseas também são comuns (Soares *et al.*, 2011).

A cirurgia é raramente possível e, até ao momento, não existe um tipo de tratamento eficaz para este tipo de carcinomas (Kondo *et al.*, 2006).

Os ATC surgem muitas vezes associados a WDTC, podendo coexistir no mesmo tumor áreas de ATC e WDTC. Este tipo de tumores sugere um processo de dediferenciação dos WDTC. Outros ATC, nos quais não são identificadas evidências de diferenciação, poderão surgir *de novo* (Soares *et al.*, 2011).

A dediferenciação das células destes carcinomas implica a perda de expressão de receptores e transportadores específicos da tiróide, como o TSHR e o NIS, respectivamente, que impede a absorção de iodo e a produção das hormonas tiroideias (Legakis e Syrigos, 2011).

A nível molecular, os ATC apresentam frequentemente mutações em genes como o *TP53* (Ito *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1996) e em genes da via Wnt como o *CTNNB1* (Garcia-Rostan *et al.*, 1999; Garcia-Rostan *et al.*, 2001) e o *AXIN1* (Kurihara *et al.*, 2004), e também no gene *PIK3CA* (Garcia-Rostan *et al.*, 2005). Estas mutações são exclusivas dos tumores mais agressivos da tiróide, estando ausentes, ou presentes numa frequência muito baixa, nos WDTC.

Para além do seu papel no aparecimento dos WDTC, os genes *RAS* e *BRAF* também se encontram alterados nos ATC, sendo que as mutações no *BRAF* se encontram essencialmente associadas a ATC com áreas bem diferenciadas, de PTC. Estes casos de ATC poderão resultar de uma progressão a partir dos WDTC (Kondo *et al.*, 2006).

Nas secções seguintes será feita uma descrição mais detalhada dos eventos moleculares mais frequentes em ATC.

4. Modelo de progressão dos carcinomas da tiróide

A progressão tumoral ocorre devido a um aumento da instabilidade genómica, que resulta essencialmente da acumulação de alterações genéticas.

Como já foi referido, os PDTC e ATC podem surgir *de novo*, ou então como resultado de uma progressão dos carcinomas bem diferenciados (Taccaliti *et al.*, 2012). Existem várias evidências histológicas, comportamentais e moleculares desta progressão. A existência dos PDTC representa por si só, uma evidência da progressão dos WDTC, uma vez que são um histotipo intermédio entre os WDTC e os ATC (Kondo *et al.*, 2006). Outra evidência é a presença de áreas diferenciadas em carcinomas com zonas indiferenciadas (DeLellis *et al.*, 2004). As mutações exclusivas dos histotipos mais agressivos poderão representar eventos que ocorrem numa fase mais avançada da progressão tumoral, enquanto que as mutações comuns a WDTC, PDTC e ATC, serão eventos iniciais responsáveis pelo aparecimento dos tumores da tiróide (Figura I.4) (Kondo *et al.*, 2006).

Estudos de expressão global dos tumores da tiróide têm sido utilizados para identificar as vias de sinalização alteradas nos diferentes histotipos. A expressão dos genes nos tumores da tiróide reflecte as diferenças no grau de diferenciação, sugerindo, também, a progressão tumoral dos WDTC para PDTC e ATC (Rusinek *et al.*, 2011).

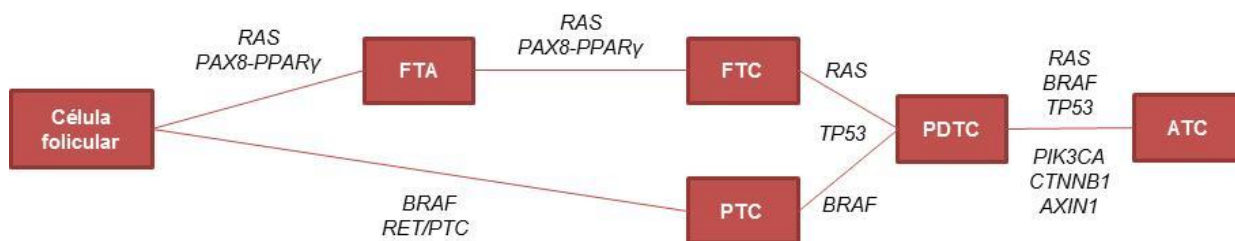


Figura I.4 - Representação esquemática da progressão dos carcinomas da tireóide (Adaptado de Kondo *et al.*, 2006).

5. Estudo dos perfis de expressão génica globais nos tumores da tireóide

Os estudos dos perfis de expressão génica globais dos tumores da tireóide permitem identificar os genes diferencialmente expressos entre os diferentes tipos de tumores e, também, entre os tumores e a tireóide normal. A informação que se obtém sobre os genes com expressão diferencial entre os diferentes tecidos, permite identificar, e estudar de forma mais direccionada, as vias de sinalização envolvidas na origem e progressão destes tumores (Rusinek *et al.*, 2011).

Vários estudos de expressão génica global têm sido realizados em tumores primários e linhas celulares da tireóide, com o intuito de identificar marcadores moleculares dos carcinomas mais agressivos da tireóide (Onda *et al.*, 2004; Pallante *et al.*, 2005; Fluge *et al.*, 2006; Salvatore *et al.*, 2007; Wiseman *et al.*, 2007; Montero-Conde *et al.*, 2008). Foram encontradas assinaturas moleculares comuns entre os PDTC e ATC, relacionadas com o ciclo celular, proliferação celular, adesão celular e metastização.

5.1. Assinaturas moleculares de PDTC e ATC

Em 2009, o nosso grupo, o Grupo de Endocrinologia Molecular do IPOLFG, publicou um estudo em que, utilizando *arrays* de oligonucleótidos, se identificaram os perfis de expressão génica globais de tumores da tireóide (Pita *et al.*, 2009). Este estudo antecedeu o projecto da presente tese de Mestrado. O objectivo deste estudo foi identificar genes envolvidos no processo de desdiferenciação dos carcinomas da tireóide, que poderão representar alvos terapêuticos. Foram analisados 5 PDTC *versus* 3 tecidos de tireóide normal. Subsequentemente, foi realizado pelo mesmo grupo um novo estudo, ainda não publicado, de 6 ATC *versus* 4 tecidos de tireóide normal. As assinaturas moleculares encontradas no estudo dos PDTC estavam relacionadas com a regulação do ciclo celular, proliferação celular, mau prognóstico (metástases e tumores de alto grau), adesão celular e ainda com o controlo da segregação cromossómica. Em ATC, as assinaturas moleculares encontradas estavam relacionadas com a regulação do ciclo celular, proliferação celular, manutenção da matriz extracelular, processo de transição epitélio-mesenquimatosa (EMT), adesão celular, funções epiteliais, funções tiroideias e também com os genes supressores de tumor.

5.1.1. Ciclo celular e proliferação celular

O ciclo celular é constituído por quatro fases distintas: a fase S (Síntese) e M (Mitose) nas quais ocorre, respectivamente, a síntese de DNA e a divisão deste por duas células-filhas idênticas, e também as fases de intervalo (inglês *Gap*): a fase G₁ e a fase G₂, nas quais a célula se prepara para as fases S e M, respectivamente (Figura I.5).

Este é um dos processos celulares mais importantes e a sua desregulação pode ter efeitos muito negativos para as células. Como tal, o ciclo celular é regulado em *checkpoints* por elementos que induzem a sua progressão, os complexos entre as ciclinas E, A e D e as cinases dependentes de ciclinas (CDK), e por elementos que inibem a progressão, os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs) (Park e Lee, 2003). Os complexos CDK/ciclinas induzem a fosforilação da pRb, que leva à sua inactivação, perdendo a sua função repressora da transcrição, que habitualmente exerce através da ligação aos membros da família de factores de transcrição E2F e recrutamento de repressores (Sherr, 2000). Estes mecanismos estão envolvidos na regulação da transição da fase G₁ para a fase S. O outro ponto de regulação ocorre entre a fase G₂ e a fase M e inclui, da mesma forma, a associação/dissociação da CDK CDC2 com as ciclinas A ou B (Park e Lee, 2003).

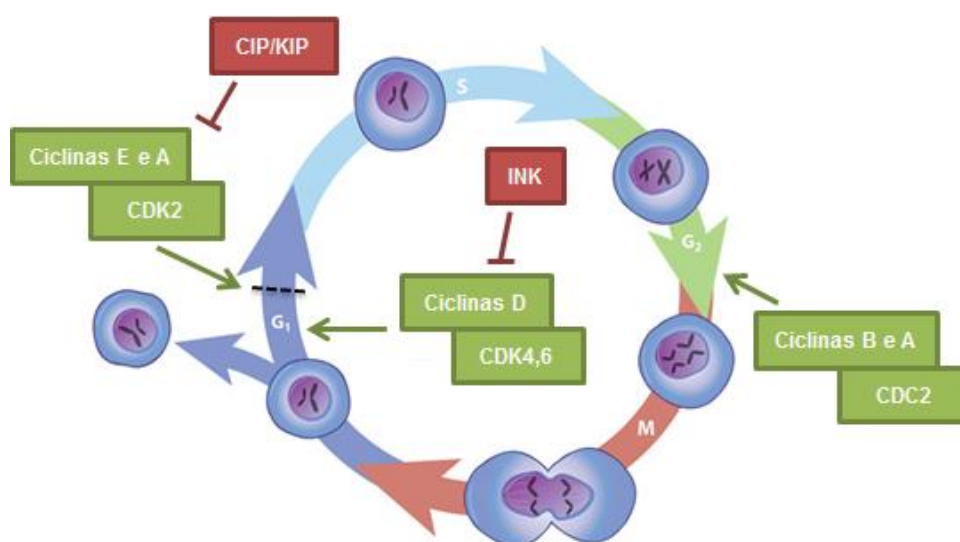


Figura I.5 - O ciclo celular e os respectivos *checkpoints*. Os complexos activadores do ciclo celular estão representados a verde; Os inibidores do ciclo celular estão representados a vermelho (INK - p14^{ARF}/p16^{INK4A}, p15^{INK4B} e p18^{INK4C}; CIP/KIP - p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}). O ponto do ciclo celular indicado a tracejado representa o ponto de restrição, após o qual a célula se encontra irreversivelmente comprometida para a próxima divisão. (Adaptado de www.nature.com/scitable e Park e Lee, 2003)

5.1.1.1. Inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs)

Os CKIs inibem a progressão do ciclo celular impedindo a associação das ciclinas com as CDK. Existem duas famílias de CKIs: a família INK e a família CIP/KIP. A família INK é constituída pelos genes *CDKN2A* (INK4A/4D; codifica as proteínas p14^{ARF}/p16^{INK4A}), *CDKN2B* (INK4B; codifica a proteína p15^{INK4B}) e o *CDKN2C* (INK4C; codifica a proteína p18^{INK4C}). Estes CKIs actuam na regulação da progressão do ciclo celular no início da fase G₁ (Figura I.5), onde, em resposta a sinais de inibição do crescimento, se ligam às CDK 4 e 6 e previnem a sua associação com ciclinas do tipo

D. Da família CIP/KIP, fazem parte os genes *CDKN1A* (CIP1; codifica a proteína p21^{CIP1/WAF1}), *CDKN1B* (KIP1; codifica a proteína p27^{KIP1}) e o gene *CDKN1C* (KIP2; codifica a proteína p57^{KIP2}). Esta família de CKIs actua numa fase mais tardia da fase G1 (Figura I.5), em que ocorre a decisão celular sobre a passagem à fase S. As proteínas CIP/KIP impedem a associação das CDK 2 com as ciclinas E e A (Park e Lee, 2003).

A regulação da progressão do ciclo celular é um dos mecanismos de protecção da célula que é necessário suprimir para que ocorra a tumorigénese. As formas mais comuns de inactivação deste mecanismo são através da sobre-expressão das ciclinas ou CDK, principalmente CDK 4 e 6, ou pela inactivação dos CKIs, principalmente os genes *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDKN1B* (Malumbres e Barbacid, 2001).

O gene *CDKN2A* codifica duas proteínas diferentes, a p16^{INK4A} e a p14^{ARF} que têm o primeiro exão diferente mas partilham os segundo e terceiro exões. Estas proteínas desempenham funções diferentes. No entanto, a p16^{INK4A} tem a mesma função que a p15^{INK4B}, codificada pelo gene *CDKN2B*, de inibir as CDK 4 e 6 de se associarem às ciclinas D e induzirem a progressão do ciclo celular. Por outro lado, a p14^{ARF} tem como função a regulação dos níveis de p53 em resposta a stress oncogénico e sinais de crescimento anómalos. A p14^{ARF} liga-se à Mdm2 (*Murine Double Minute 2*) e inactiva-a, regulando positivamente a p53 (Stott *et al.*, 1998). Para além disso, também interage e antagoniza a função oncogénica das proteínas Myc e E2F1, impedindo a progressão tumoral, num mecanismo independente da p53 *wild type* (*wt*) (Ozenne *et al.*, 2010).

A hipermetilação do promotor do gene *CDKN2A* é frequentemente observada em diversos tipos de tumores, induzindo o silenciamento do gene (Elisei *et al.*, 1998). Os genes *CDKN2A* e *CDKN2B* estão localizados no mesmo *locus* cromossómico (9p21), e a deleção em homozigotia deste *locus* é muito comum em vários tipos de tumores, nomeadamente melanoma e leucemia (Elisei *et al.*, 1998; Canepa *et al.*, 2007). Alguns investigadores têm pesquisado alterações nos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, em carcinomas da tiróide, tanto em linhas celulares como em tumores primários. Em 1996, Tung e colaboradores pesquisaram deleções e mutações pontuais no gene *CDKN2A* e identificaram mutações em 0% (0/15) dos PTC, 7% (1/15) dos FTC e em 20% (1/5) dos ATC. Identificaram ainda uma deleção do gene numa amostra de ATC (Tung *et al.*, 1996). Foi realizada também em 1996, uma pesquisa de mutações e deleções nos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, em linhas celulares e tumores primários da tiróide. Foram identificadas mutações e deleções em linhas celulares, nomeadamente uma deleção de ambos os genes na linha celular de FTC WRO, e uma mutação *nonsense* na linha celular de ATC FRO. Nos tumores primários, identificou-se apenas 1 mutação no gene *CDKN2A* num PTC (1/12). Para o gene *CDKN2B* não foram identificadas quaisquer alterações em 12 PTC e 8 FTA analisados (Jones *et al.*, 1996).

Em 2008, um estudo realizado por Lee *et al.*, identificou por CGH uma deleção no *locus* dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* numa amostra de ATC, e, por Western blot, ausência de expressão de p16^{INK4A} em 24/27 ATC (89%). Em FTA, FTC e PTC observou-se uma sobre-expressão das proteínas p14^{ARF} e p16^{INK4A}. Apesar de parecer contraditório, está descrita uma associação entre o aumento de expressão destas proteínas e o aumento de agressividade dos tumores. Os autores sugerem várias explicações para este facto. Em relação à sobre-expressão da p16^{INK4A}, é possível que resulte de

uma perda de repressão da transcrição devido a mutações inativadoras do gene *RB1*, representando um mecanismo compensatório. Para além disso, tem sido sugerido que a inibição do ciclo celular pela $p16^{\text{INK4A}}$ ocorre apenas quando o complexo Cdk2/ciclina E se encontra inativado também pelo inibidor $p27^{\text{KIP1}}$. Assim, caso haja perda de repressão pela $p27^{\text{KIP1}}$, a sobre-expressão da $p16^{\text{INK4A}}$ não terá efeito na inibição do ciclo celular. A sobre-expressão da $p14^{\text{ARF}}$ poderá ser explicada pelo facto de esta proteína ser induzida por oncogenes como *MYC*, *RAS* ou *E2F1*. Desta forma, a desregulação destas vias de sinalização poderá induzir uma sobre-expressão da $p14^{\text{ARF}}$ (Ferru *et al.*, 2006).

O gene *CDKN2C* ($p18^{\text{INK4C}}$) encontra-se inativado por mutação em linhas celulares de carcinomas da mama (Lapointe *et al.*, 1996; Zariwala *et al.*, 1996). Recentemente, foram identificadas mutações neste gene em MTC com mutação germinal ou somática no proto-oncogene *RET*, sugerindo uma acção sinérgica no desenvolvimento e progressão destes tumores, que habitualmente se encontram associados à síndrome MEN2 (van Veelen *et al.*, 2008; van Veelen *et al.*, 2009; Georgitsi, 2010). Para além da inactivação por mutação, o silenciamento deste gene por hipermetilação do promotor também é frequente em adenomas hipofisários (cerca de 40%) (Kirsch *et al.*, 2009). É esperado que a perda funcional deste CKI induza, tal como tem sido descrito para outros CKIs, um descontrolo da proliferação celular, aumentando o risco de formação de tumores.

O gene *CDKN1A*, que codifica a proteína $p21^{\text{CIP1/WAF1}}$, foi o primeiro alvo da p53 a ser identificado. El-Deiry *et al.* (1993) associou a expressão deste gene apenas à p53 *wt* e não à p53 mutante, numa linha celular de tumor do cérebro. É um dos mecanismos pelo qual a p53 induz a paragem do ciclo celular e inibição da transcrição. Este é considerado o elo de ligação entre as vias p53 e pRb. Tendo em conta a função do gene *CDKN1A*, possíveis alterações moleculares poderão ter efeitos tumorigénicos. A deleção do gene *CDKN1A* ocorre em 13% dos PTC (Kondo *et al.*, 2006). Foi realizado recentemente um estudo em ATC e PTC, no qual se avaliou por *microarrays* a expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular, que incluiu a $p21^{\text{CIP1/WAF1}}$. Foi identificada a sub-expressão desta proteína em ATC, que estava correlacionada com uma diminuição na sobrevivência (Evans *et al.*, 2012).

A proteína $p27^{\text{KIP1}}$, codificada pelo gene *CDKN1B*, tem um papel importante na inibição da tumorigénese, devido à sua função de inibidora da progressão do ciclo celular. De facto, a p27 é sub-expressa em aproximadamente 50% dos tumores em humanos. Esta sub-expressão está, normalmente, relacionada com uma maior agressividade do tumor e um mau prognóstico. Não sendo frequentes as mutações somáticas neste gene, é possível que a sua sub-expressão seja regulada por mecanismos pós-transcricionais (Marinoni e Pellegata, 2011). No entanto, alguns estudos têm identificado alterações neste gene em diversos tipos de tumores. O SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) -79 C/T deste gene tem sido associado a cancro da próstata familiar (Chang *et al.*, 2004) e, recentemente a carcinomas da tiróide, nomeadamente às variantes foliculares dos PTC (fvPTC) (Landa *et al.*, 2010). O SNP V109G foi identificado como factor de prognóstico para os MTC, estando associado à progressão destes tumores (Pasquali *et al.*, 2011). Mutações germinais no gene *CDKN1B* são responsáveis pela síndrome de neoplasias endócrinas múltiplas (MEN) tipo 4 (Molatore *et al.*, 2010).

5.1.1.2. O gene supressor de tumor *TP53*

A função de supressor tumoral do gene *TP53* (*Tumour Protein 53*) foi descoberta no final dos anos 80 (Brosh e Rotter, 2009). Desde então tem vindo a ser alvo de intensa investigação, principalmente na área do cancro, devido ao seu importante papel e potencial como alvo terapêutico para uma grande variedade de carcinomas.

O gene *TP53* tem 11 exões, que compreendem 393 resíduos de aminoácidos (aa.) em cinco domínios propostos (Figura I.6a): um de transactivação (TAD, aa. 1-40) necessário para activação da transcrição; um domínio rico em resíduos de prolina (PRD, aa. 61-94) que tem como função facilitar interacções entre proteínas; um domínio de ligação ao DNA (DBD, aa. 100-300), que liga esta proteína especificamente a sequências consenso nos promotores dos seus genes-alvo; um domínio de tetramerização (4D, aa. 324-355) e um domínio de regulação da região terminal-C (CTD, aa. 360-393). A proteína codificada por este gene, a p53, tem aproximadamente 53 kDa, e é um factor de transcrição que funciona sob a forma de tetrâmero, em resposta ao *stress* celular. Os genes-alvo da p53 têm um papel importante na regulação do ciclo celular, apoptose, senescência, reparação do DNA e no metabolismo (Brosh e Rotter, 2009).

Em células que não estão sob *stress*, a p53 é mantida em baixos níveis através da proteína Mdm2 que inibe a sua actividade e a marca para degradação (Figura I.6a). Este mecanismo funciona como um feedback negativo entre a p53 e a Mdm2, e os níveis relativos destas duas proteínas regulam-se consoante a situação na célula. A estabilização da p53 ocorre em resposta a qualquer dano intracelular (Figura I.6b) (Hanahan e Weinberg, 2011). A Mdm2 é inactivada pela p14^{ARF} (ver secção 5.1.1.1), permitindo a acumulação da p53 (Stott *et al.*, 1998). Uma vez activa, a p53 “decide” o destino da célula consoante a dimensão dos danos presentes: pode induzir a paragem do ciclo celular, promovendo a expressão do CKI p21^{WAF1} (el-Deiry *et al.*, 1993), para que haja uma reparação dos danos, ou pode induzir a apoptose. Desta forma, a p53 previne a multiplicação de células com alterações no DNA, que poderiam iniciar um processo tumoral (Bourdon, 2007).

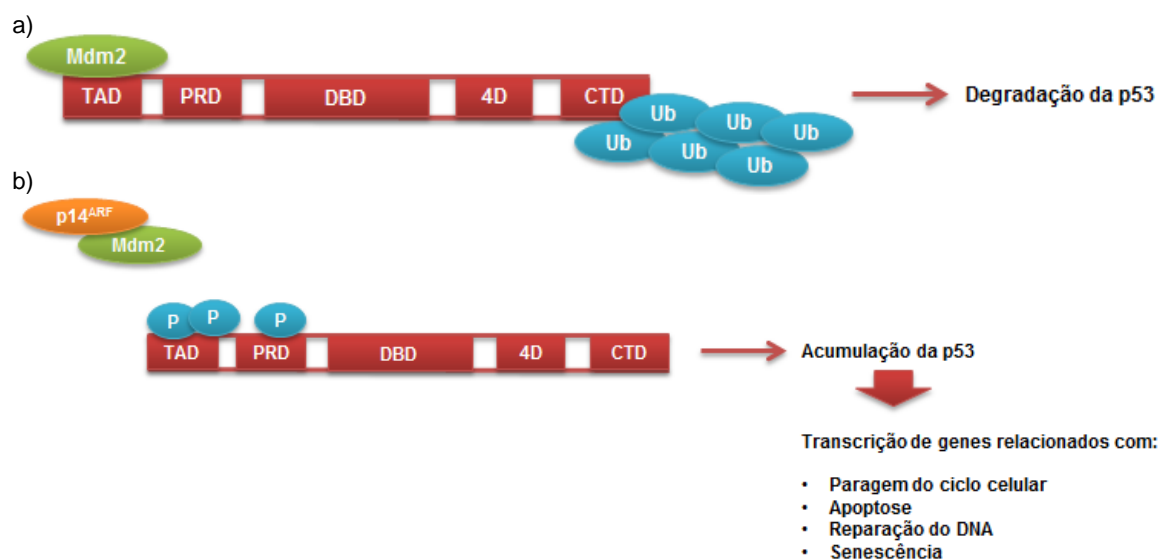


Figura I.6 - p53 e o seu mecanismo de supressão tumoral. a) Célula sem stress; b) Célula sob stress. (Adaptado de Toledo e Wahl, 2006).

Uma vez que a p53 é uma das principais proteínas responsáveis por manter a integridade do genoma, impedindo a formação de tumores, torna-se evidente que as células tumorais possuem mecanismos que lhes permitem ultrapassar a sua acção protectora. Um dos mecanismos mais frequentes (74%) é por mutações monoalélicas *missense* a nível somático (Brosh e Rotter, 2009). Este gene apresenta mutações em mais de 50% dos casos de cancro em humanos (Willis *et al.*, 2004). A proteína p53 mutada é acumulada nas células, e pode ser detectada por imunohistoquímica (IHC), o que, normalmente, não é possível para a p53 *wt* (Brosh e Rotter, 2009).

Cerca de 95% das mutações detectadas no gene da *TP53* encontram-se no DBD (exões 5-8) (Ozaki e Nakagawara, 2011). Desta forma, a p53 perde a capacidade de se ligar aos seus genes-alvo e exercer a sua função de supressora tumoral. Está também descrito um efeito dominante negativo (DN) que o alelo mutante exerce sobre o alelo *wild-type* (*wt*) (Figura I.7). Desta forma, uma mutação em apenas um dos alelos, resulta numa perda de função, o que não acontece com outros supressores tumorais (Willis *et al.*, 2004). As mutações *missense* no *TP53* conferem ainda outra vantagem para estes tumores: o ganho de capacidades oncogénicas (GOF) (Figura I.7), independentes da proteína *wt*. Os genes-alvo da p53 mutante diferem daqueles da p53 *wt*, uma vez que têm capacidades oncogénicas, em vez de supressoras tumorais. Nomeadamente, estes genes alvo activam a proliferação celular, aumentam a resistência a fármacos, a sobrevivência e a capacidade metastática (Brosh e Rotter, 2009). A p53 mutante induz também a inactivação de outros membros da sua família, a p63 e a p73, que também actuam como supressoras de tumorais, (Brosh e Rotter, 2009).

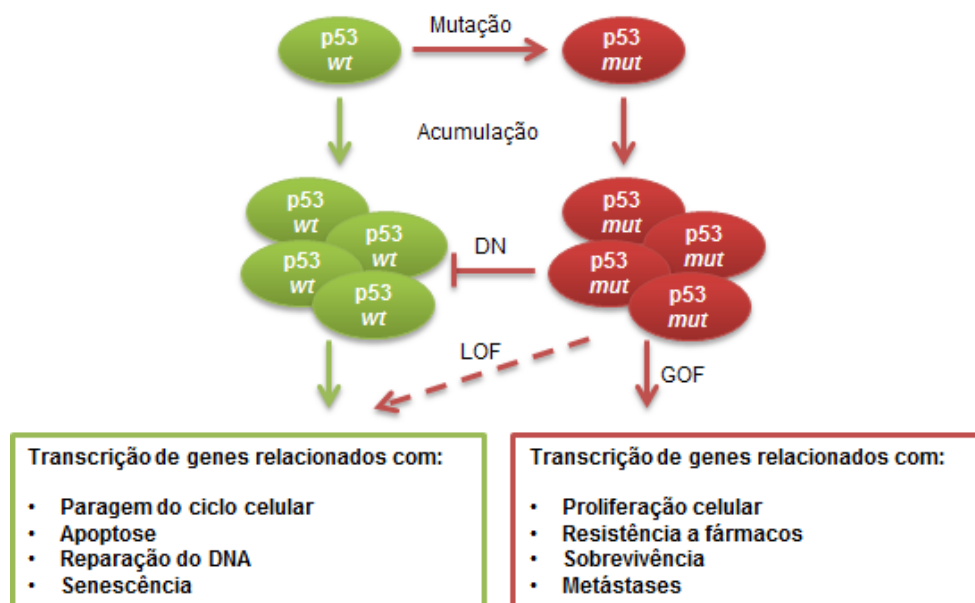


Figura I.7 - Mecanismo de acção da proteína p53 *wt* versus p53 mutante (*mut*) (Adaptado de Brosh e Rotter, 2009). DN – Efeito dominante-negativo; LOF – Perda de capacidades anti-tumorigénicas; GOF – Ganho de capacidades oncogénicas. A vermelho estão representados eventos pró-tumorigénicos. A verde estão representados eventos anti-tumorigénicos. A seta a tracejado indica as funções perdidas pela p53 *mut*.

As mutações no gene *TP53* têm sido associadas a estados mais avançados e mais agressivos dos carcinomas da tiróide. Vários estudos descrevem uma frequência elevada de mutações nos PDTC (26%) (Soares *et al.*, 2011) e ATC (47-86%) (Ito *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2007). No entanto, como já referido, a maioria dos estudos de pesquisa de mutações no gene *TP53* em PDTC e ATC foram realizados na década de 90, quando ainda não havia concordância relativamente aos critérios de classificação dos PDTC, e como tal, algumas mutações poderão não estar correctamente associadas ao tipo de tumor a que correspondem. Na base de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations In Cancer*; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>), que compreende vários estudos realizados em PDTC e ATC, 65% dos ATC analisados apresentam mutações no *TP53*.

Estudos por IHC têm detectado p53 numa elevada percentagem de ATC e PDTC (64%), o que sugere que a proteína também esteja alterada (Gauchotte *et al.*, 2011).

5.1.1.3. A via de sinalização das MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) – ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase)

As vias de sinalização das MAPK (Figura 1.8) regulam funções celulares fundamentais à manutenção da homeostase celular, tais como o crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Dhillon *et al.*, 2007). Estas vias são constituídas por três ou mais proteínas cinases em cascata. A proteína cinase a montante na via designa-se MAPKKK ou MAP3K (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*), e quando activada, fosforila e activa a cinase seguinte, MAPKK ou MAP2K (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*), que por sua vez, quando activada, fosforila a cinase seguinte, a MAPK, activando-a. Quando activada, a MAPK induz a transcrição dos genes-alvo de cada via (Dhillon *et al.*, 2007; Lawrence *et al.*, 2008).

Existem diversos tipos de MAPK, nomeadamente a ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) 1 e 2, a JNK (*Jun N-terminal Kinase*) e a p38. As diferentes MAPK são activadas por diferentes vias de sinalização (Dhillon *et al.*, 2007).

A via de sinalização ERK é uma das vias mais estudadas em cancro, uma vez que é responsável pela regulação da proliferação, diferenciação, apoptose e migração celulares (Dhillon *et al.*, 2007). Nesta via, a MAP2K designa-se MEK (MEK1 e MEK2), e a MAP3K designa-se Raf (A-Raf, B-Raf e C-Raf) que é activada pela GTPase Ras, sendo a B-Raf a proteína Raf com maior poder de activação da via (Dhillon *et al.*, 2007; Legakis e Syrigos, 2011).

A família de proteínas Ras engloba três proteínas de 21 kDa (Legakis e Syrigos, 2011), K-, N- e H-Ras, que são activadas quando um receptor tirosina cinase (*Receptor Tyrosine Kinase*, ou RTK), como o RET ou EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), é activado pelo ligando. A Ras activada recruta a Raf e activa-a, induzindo a sinalização em cascata (Lawrence *et al.*, 2008).

Estão descritos vários mecanismos que as células tumorais adquirem para activar constitutivamente esta via. As mutações nos componentes da via Ras e B-Raf são as formas mais frequentes de activação da via (Dhillon *et al.*, 2007).

A proteína B-Raf encontra-se mutada em 20% de todos os tumores humanos de acordo com a base de dados COSMIC. As mutações no gene *BRAF*, que codifica esta proteína, localizam-se quase

exclusivamente (> 95%) no codão 600, localizado no domínio de cinase da proteína, onde ocorre a substituição de um resíduo de Valina por um resíduo de Glutamato (V600E) (Davies *et al.*, 2002; Nikiforov, 2011). Esta mutação activa a proteína B-Raf de forma constitutiva, tornando a sinalização da via independente dos sinais de crescimento (Nikiforov, 2011).

Nos tumores da tiróide, mutações no gene *BRAF* são detectadas frequentemente nos PTC variante clássica (40-45%), e em apenas 10% dos fvPTC (Nikiforov, 2011). Nos ATC com focos de PTC estão descritas 10-44% de mutações no gene *BRAF* (Soares *et al.*, 2011) e nos ATC sem focos de WDTC, 14,3% (Takano *et al.*, 2007).

As proteínas Ras são codificadas pelos genes *K-*, *H-* e *N-RAS*. Estes genes encontram-se mutados em 15% dos tumores humanos (Davies *et al.*, 2002). As mutações ocorrem preferencialmente nos codões 12, 13 (exão 1) e 61 (exão 2), e aumentam a afinidade para ligação do GTP ou impedem a hidrólise do GTP ligado, mantendo a proteína Ras no seu estado activo (Legakis e Syrigos, 2011; Nikiforov, 2011).

Vários estudos em tumores da tiróide sugerem que as alterações nos genes *RAS* e *BRAF* representam eventos iniciais no aparecimento destes tumores (Legakis e Syrigos, 2011). Em tiróide, as mutações nos genes *RAS* ocorrem quase exclusivamente no codão 61 dos genes *N-* e *H-RAS*, e são comuns nos fvPTC (15-20%) e FTC (40-50%). Estas mutações são, no entanto, mais frequentes no gene *N-RAS* (Nikiforov, 2011). Existem também evidências de que as mutações no codão 61 do gene *N-RAS* estarão associadas à progressão tumoral e a um comportamento mais agressivo (Legakis e Syrigos, 2011), sendo frequentemente detectadas nos carcinomas menos diferenciados PDTC (18-55%) e ATC (4-60%) (Soares *et al.*, 2011).

5.1.1.4. A via de sinalização PI3K (*Phosphatidylinositol-3 Kinase*)/Akt

A via de sinalização PI3K/Akt (Figura I.8) regula diversos processos na célula, tais como o crescimento, proliferação, mobilidade e sobrevivência celulares. A classe I da família de proteínas PI3K é a mais estudada e importante na tumorigénese (Xing, 2010). Esta classe é constituída por heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica (p110), e uma subunidade regulatória (p85). As subunidades p110 subdividem-se em dois tipos: α (PIK3CA) e β (PIK3CB), que constituem a subclasse IA, activada maioritariamente por RTKs como os receptores RET, VEGFR (*Vascular Epidermal Growth Factor Receptor*), e EGFR. As subunidades p110 possuem um local de ligação da subunidade p85, que permite a integração dos sinais desde o receptor, de forma a activar a subunidade catalítica. As p110 possuem ainda um local de ligação da proteína Ras, que desta forma, activa, não só a via de sinalização ERK, mas também a via de sinalização do PI3K/Akt (Fresno Vara *et al.*, 2004; Xing, 2010).

As proteínas PI3K activas, fosforilam o fosfolípido PI(4,5)P₂ (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*, ou PIP₂), originando o segundo mensageiro desta via, o PI(3,4,5)P₃ (*Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*, ou PIP₃). O PIP₃ liga-se especificamente a proteínas que contenham um domínio de ligação a lípidos, como o domínio PH (*Pleckstrin Homology*). A proteína Akt possui este domínio, e é recrutada para a membrana pelo PIP₃, e activada por fosforilação, pelas PDK (*Phosphoinositide-Dependent Kinases*) (Fresno Vara *et al.*, 2004; Xing, 2010). Após activada, a

Akt fosforila proteínas efectoras, entre as quais se inclui a mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), envolvida em vários tipos de cancro, a Mdm2 que inibe a p53, e a p27^{KIP1} que é inactivada (Fresno Vara *et al.*, 2004). A proteína PTEN (*Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome TEN*) é um regulador negativo desta via. Sendo uma fosfatase, desfosforila o PIP3, que passa a estar sob a forma PIP2, impedindo que a Akt seja activada (Xing, 2010).

A manutenção da regulação da via de sinalização do PI3K/Akt é fundamental para evitar a tumorigénese, uma vez que está envolvida em processos desregulados nas células neoplásicas. As mutações mais comuns nesta via ocorrem no gene *PIK3CA*, que codifica a subunidade catalítica da PI3K mantendo-a constitutivamente activa, no gene *PTEN*, inactivando-o, e ainda nos genes *RAS*.

O gene *PIK3CA* encontra-se mutado em 25-40% dos carcinomas colorectais, da mama, gástricos, do ovário e do cérebro (Samuels *et al.*, 2004; Garcia-Rostan *et al.*, 2005). As mutações ocorrem preferencialmente nos exões 9 e 20. Nos carcinomas da tiróide também foram realizadas pesquisas de alterações neste gene. Relativamente aos WDTC, as mutações no gene *PIK3CA*, embora raras, são mais comuns em FTC (7%) do que em PTC (2%) de acordo com a base de dados COSMIC. Os resultados obtidos nos diferentes estudos realizados em ATC são controversos. Em algumas séries de tumores não se identificaram mutações, apenas amplificações do gene (Wu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Por outro lado, noutros estudos foram identificadas mutações em 6% dos PDTC (Ricarte-Filho *et al.*, 2009), e mutações em 6-23% dos ATC (Garcia-Rostan *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2007; Ricarte-Filho *et al.*, 2009).

Foram ainda identificadas mutações no gene *PTEN* e activação da Akt1 em 17% (Liu *et al.*, 2008) e em 85-93% (Garcia-Rostan *et al.*, 2005; Santarpia *et al.*, 2008) dos ATC, respectivamente.

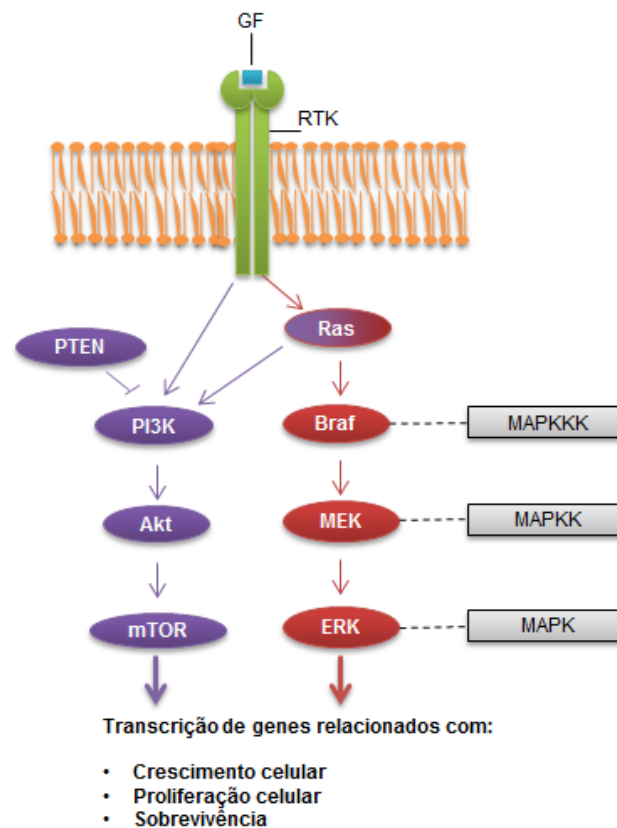


Figura I.8 - As vias de sinalização PI3K/Akt (representada a roxo) e ERK/MAPK (representada a vermelho). GF – Factor de crescimento. (Adaptado de Kim e Bar-Sagi, 2004 e Xing, 2010)

5.1.2. Adesão celular, transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) e metastização

A transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) é um processo de transformação de células epiteliais em células com características mesenquimatosas. As células epiteliais são caracterizadas pela sua organização preservada pelo contacto entre células vizinhas. Por outro lado, as células mesenquimatosas não necessitam desse contacto, e possuem características que lhes conferem a possibilidade de sintetizar e organizar novos componentes da matriz extracelular, através da produção de metaloproteinases que degradam a matriz (*Matrix-Degrading Metalloproteinases* - MMPs) (Radisky, 2005). Durante a EMT ocorre o aumento da expressão das proteínas vimentina e miosina e também a aquisição de motilidade invasiva (Hay, 2005), que confere às células a capacidade de migração para zonas distintas do corpo humano (Thiery, 2002). A EMT é essencial durante o processo de embriogénese, nomeadamente na gastrulação, durante a qual o epitélio dá origem à mesoderme, que mais tarde se diferencia em vários tipos de tecidos (Mani *et al.*, 2008).

A EMT é, também, um mecanismo utilizado pelas células tumorais para aumentar a sua capacidade de invasão. Têm sido identificadas várias vias de sinalização envolvidas na EMT durante a progressão tumoral. Um dos factores mais importantes neste processo é a perda da expressão da E-caderina, uma vez que esta proteína é responsável pelo fenótipo epitelial. A E-caderina liga-se aos microfilamentos de actina no citoplasma através da β -catenina (Thiery, 2002). A E-caderina é essencial para a manutenção de junções de aderência estáveis. Em contraste, a N-caderina é produzida em alguns tipos de carcinoma, de forma a compensar a falta de E-caderina. Este funciona como um sistema de adesão fraco (Thiery, 2002). A sub-expressão de E-caderina é evidente em vários tipos de tumores com EMT, incluindo os ATC com áreas de WDTC (Liu e Brown, 2010).

5.1.2.1. A via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt é responsável pela regulação de processos como a proliferação e polarização celulares, a determinação da localização e tipo de diferenciação das células durante a embriogénese, e a manutenção do fenótipo estaminal (MacDonald *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Existem duas vias de sinalização Wnt: a via Wnt/ β -catenina, designada por via canónica; e a via não canónica, que não envolve a β -catenina. A via Wnt/ β -catenina tem sido estudada ao longo dos últimos anos pelo seu papel no processo tumorigénico (Sastre-Perona e Santisteban, 2012).

A via Wnt/ β -catenina é activada pelo ligando Wnt. Na ausência deste ligando a via encontra-se inactiva, e a β -catenina permanece na membrana ligada à E-caderina formando um complexo responsável pelas junções de aderência (Smallridge *et al.*, 2009; Sastre-Perona e Santisteban, 2012). A β -catenina que não está na membrana, mantém-se no citoplasma envolvida num complexo de destruição constituído pelas proteínas Axina, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*) e a CK1 (*Casein Kinase 1*). A GSK-3 e a CK1 fosforilam a β -catenina quando esta se encontra no complexo. Esta proteína fosforilada é posteriormente ubiquitinada pela β -TrCP ubiquitina ligase E3, marcando-a para destruição no proteossoma (Miller *et al.*, 1999). Na ausência de

β -catenina, os factores de transcrição TCF/LEF funcionam como repressores (Sastre-Perona e Santisteban, 2012).

O ligando Wnt liga-se ao receptor FZD (*Frizzled*) e ao co-receptor LRP5/6 (*low-density-Lipoprotein-Related Protein 5/6*), activando a via de sinalização. O receptor conecta-se ao complexo de destruição através da proteína *Dishevelled* (Dvl), inactivando-o. De acordo com um estudo recente (Li *et al.*, 2012), a β -catenina que se encontra no complexo deixa de ser ubiquitinada, e consequentemente destruída no proteossoma. Desta forma, o complexo fica saturado com β -catenina fosforilada, e a β -catenina que é sintetizada de novo, encontra-se livre e é translocada para o núcleo, onde se associa aos factores de transcrição TCF/LEF (Hendriksen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012) (Figura 1.9). É então activada a transcrição de genes relacionados com o desenvolvimento, nomeadamente o *c-myc*, *c-jun*, *MMP-26* e *cyclin-D1* (Yardy *et al.*, 2009).

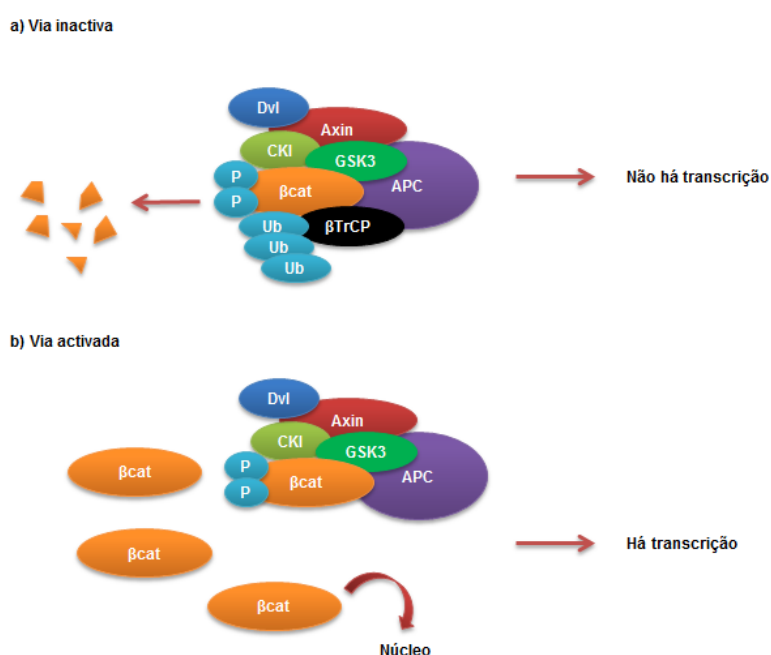


Figura 1.9 - A composição do complexo de destruição da β -catenina a) quando a via está inactiva e b) quando a via está activada (Adaptado de Li *et al.*, 2012).

5.1.2.1.1. O gene *CTNNB1* e o gene *AXIN1*

O gene *CTNNB1* codifica a proteína β -catenina. Vários estudos têm identificado alterações neste gene em diversos tipos de tumor, nomeadamente em tumores de Wilms (Li *et al.*, 2004), carcinomas colorectais (Luchtenborg *et al.*, 2005), tumores da paratiróide (Bjorklund *et al.*, 2008) e carcinomas hepatocelulares (Galy *et al.*, 2011).

Nos tumores da tiróide, as mutações neste gene têm sido descritas como uma característica dos carcinomas mais agressivos. Em 1999, Garcia-Rostan *et al.* detectaram mutações no gene *CTNNB1* em 61% dos ATC, e 42% destes tumores apresentavam imunomarcagem nuclear para a β -catenina.

Por outro lado, num estudo realizado em 2004 na população Japonesa (Kurihara *et al.*, 2004), numa série de 22 ATC identificaram-se mutações no gene *CTNNB1* em apenas 4,5% destes tumores, apesar de 4,9% apresentar imunofluorescência nuclear e 63,6% citoplásmica. No entanto, foram

identificadas mutações noutros genes da via Wnt, nomeadamente no gene *APC* (9%) e no gene *AXIN1* (81,8%). Estes resultados contradizem as publicações anteriores relativas à percentagem de mutações do gene *CTNNB1*, e sugerem que esta via esteja alterada em ATC, não devido a mutações no gene *CTNNB1*, mas num dos componentes do complexo de destruição da β -catenina, a Axina.

Para além deste estudo em ATC, foram efectuadas pesquisas de mutações no gene *AXIN1* noutros tipos de carcinomas. Identificaram-se mutações em 7-11% dos carcinomas colorectais (Jin *et al.*, 2003), hepatocelulares (Taniguchi *et al.*, 2002) e da próstata (Yardy *et al.*, 2009).

5.1.2.2. A via de sinalização do TGF- β

A via de sinalização do TGF- β é constituída por receptores do tipo I e II, que são do tipo cinases de serina/treonina. Estes receptores são activados após interacção com vários tipos de ligandos (famílias TGF- β , Activina e BMP). Da via de sinalização canónica também fazem parte os co-activadores da transcrição SMAD que têm um domínio de ligação ao DNA. As SMAD 2 e 3, ou 1 e 5, dependendo do tipo de ligando, são activadas por fosforilação e ligam-se à SMAD4, com a qual formam um complexo que é translocado para o núcleo (Figura I.10). Para que seja possível a ligação específica ao DNA e activação da transcrição dos genes-alvo desta via, é necessária a sua associação com co-factores de ligação ao DNA (Massague, 2008).

Esta via possui as mais variadas funções no organismo, tais como a capacidade de regular o crescimento, diferenciação e migração celulares (Bierie e Moses, 2006). Em células normais, ou num estado pré-maligno, a via do TGF- β mantém a homeostase através da sua função de supressão tumoral (Massague, 2008). Tal como foi mencionado acima no texto, a tumorigénese requer a supressão desta via. As formas mais comuns de inactivação incluem a perda por mutação e perda de heterozigotia (LOH) dos genes que codificam o receptor do tipo II (TGF- β RII) e a SMAD4 (Ikushima e Miyazono, 2010). No receptor, as mutações resultam geralmente numa proteína truncada, ou na supressão da actividade de cinase. A sequência deste receptor possui uma região com 10 resíduos de adeninas repetidas. Desta forma, a inactivação por mutação dos receptores do tipo II é muito comum em tumores com instabilidade de microssatélite (MSI), resultante de mutações em genes de reparação do DNA, que ocorrem com frequência em carcinomas do cólon (Massague, 2008). Para além da sua função de supressor tumoral em células normais ou pré-malignas, a via de sinalização do TGF- β tem um outro papel em células que conseguem “escapar” ao seu efeito supressor. Os tumores mais agressivos tendem a manter os componentes principais da via, apresentando mutações nos componentes secundários apenas. Assim, mantêm a sinalização através desta via para induzir a EMT, invasão, metastização e evasão ao sistema imunitário (Meulmeester e Ten Dijke, 2011).

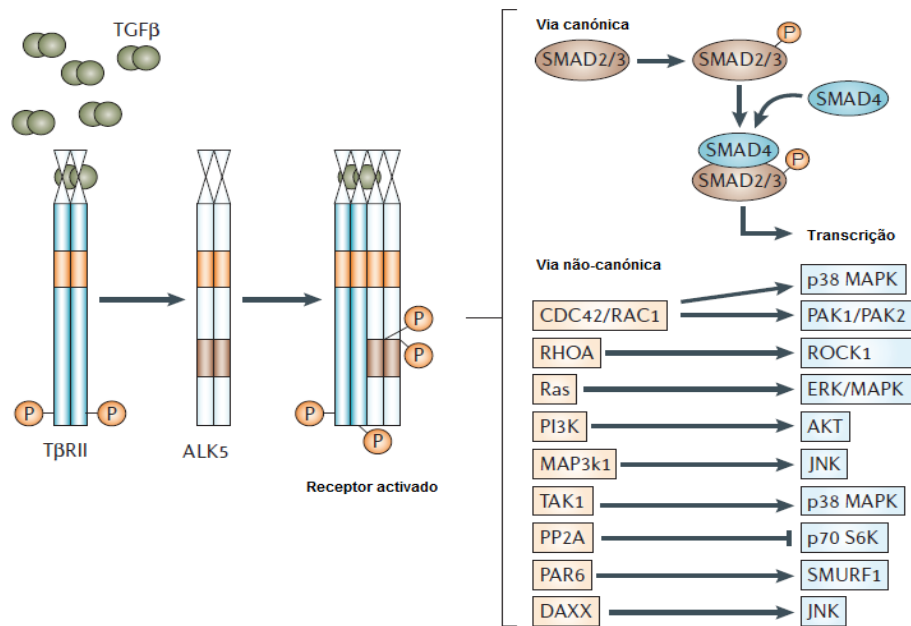


Figura I.10 - A via de sinalização do TGF- β na maioria das células (Adaptado de Brier e Moses, 2006). Em algumas células existem outros tipos de ligandos, BMP e/ou Activina, para os quais os receptores diferem. Os receptores do tipo II são os ACVR2, e os receptores do tipo I são os Alk3 e Alk4, para os ligandos BMP e Activina, respectivamente. Para o ligando BMP, as Smads activadas pelo Alk3 são as 1/5/8 em vez das Smads 2/3.

Estão descritos vários tipos de sinalização que actuam em sinergia com esta via para induzir os fenótipos tumorais mais agressivos. Em 2009, Adorno *et al.*, descreveram uma cooperação entre a p53 mutante, activada pelo oncogene Ras, e a sobre-expressão de SMAD2/3, no aumento da migração, invasão e metastização. Segundo os autores, estes efeitos resultam da formação de um complexo entre a SMAD 2/3 e p53 mutante, que recrutam uma isoforma supressora de metástases de um outro membro da família da p53, a TAp63. Su *et al.* (2010) encontraram evidências de que a relação entre a TAp63 e a supressão de metástases resulta da regulação que a TAp63 exerce sobre a Dicer e a miR-130b (Figura I.11).

a) TAp63 activa



a) TAp63 inactivada pelo complexo com p53 *mut* e Smad 2/3

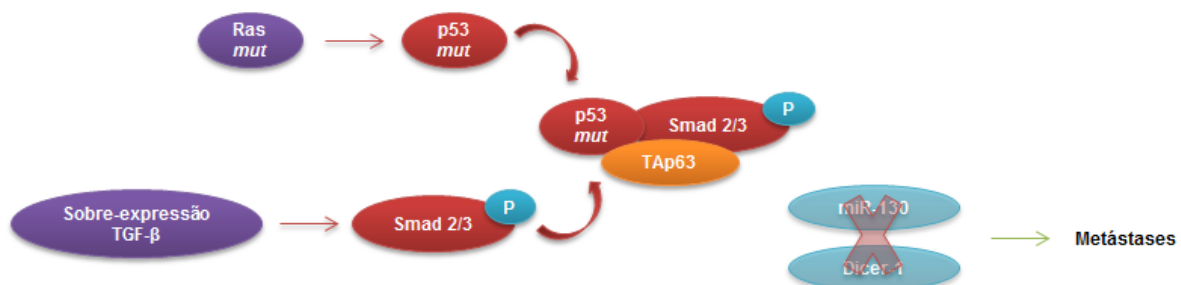


Figura I.11 - Mecanismo de inactivação da TAp63 por recrutamento para um complexo formado por p53 *mut* activada pelo Ras *mut*, e pela Smad 2/3 activada, proveniente de uma sobre-expressão da via de sinalização do TGF- β . Quando recrutada, a TAp63 fica incapaz de suprimir a formação de metástases.

Em 2008, foi estudada a relação entre o oncogene Ras e a via de sinalização do TGF- β . Horiguchi *et al.* mostraram que para que haja uma indução da proteína Snail por parte da via TGF- β , é necessária a cooperação do Ras oncogénico, ou seja, a via de sinalização ERK ou PI3K/Akt activada. As proteínas Snail e Slug são codificadas pelos genes *SNAI1* e *SNAI2*, respectivamente, e são fortes indutoras de EMT, uma vez que inibem a expressão da E-caderina. A expressão destes genes encontra-se aumentada em vários tipos de carcinomas (Zhou *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2009).

A via de sinalização do TGF- β é também responsável pela indução de outros fortes repressores da E-caderina – *EF1/ZEB1* e *SIP1/ZEB2* (Gregory *et al.*, 2008).

6. Tratamento das neoplasias da Tiróide

Os WDTC têm um excelente prognóstico. O tratamento convencional consiste em cirurgia com tiroidectomia total, e, quando necessário, terapia com iodo radioactivo (^{131}I) (Legakis e Syrigos, 2011).

Nos carcinomas mais agressivos, PDTC e ATC, há um crescimento e invasão muito rápidos. Desta forma, a sua excisão cirúrgica não é possível na maioria dos casos. Muitas vezes é realizada traqueostomia a estes doentes, como medida paliativa, retardando a morte por obstrução das vias respiratórias. Em alguns casos é realizada cirurgia com remoção parcial do tumor, para retardar a obstrução das vias respiratórias, e quimioterapia convencional, que pode tornar certos tumores operáveis e diminuir o risco de metastização. Acresce que, as células indiferenciadas não respondem ao iodo radioactivo, como acontece com os WDTC. Deste modo, os PDTC e ATC têm habitualmente um mau prognóstico (Smallridge e Copland, 2010; Legakis e Syrigos, 2011; Taccaliti *et al.*, 2012).

Têm sido realizados alguns ensaios clínicos em WDTC, PDTC e ATC, mas até ao momento, não foi determinada uma terapia suficientemente eficaz para os carcinomas mais agressivos, e os doentes de ATC são constantemente alvos de novos ensaios clínicos.

Um estudo realizado em 2009 (Swaak-Kragten *et al.*, 2009) demonstrou remissão em 89% (9/10) dos casos de doentes com ATC que foram tratados com cirurgia com remoção completa ou quase completa do tumor, radioterapia e quimioterapia de acordo com um protocolo previamente estabelecido. Foi também testada em 5 doentes com ATC, a combinação de radioterapia com docetaxel (composto anti-mitótico) (Troch *et al.*, 2010), com resultados positivos em 2 doentes, e parciais em 2 doentes. Testou-se também uma terapia múltipla agressiva, envolvendo cirurgia, quando possível, radioterapia e quimioterapia adjuvante (Yau *et al.*, 2008; Foote *et al.*, 2011). A combinação de radioterapia, com os citostáticos doxorubicina e cisplatina demonstrou resultados positivos em 50% dos doentes envolvidos num ensaio clínico realizado na Sérvia (Vrbic *et al.*, 2009).

Devido ao fracasso dos métodos de tratamento existentes para os carcinomas da tiróide mais agressivos, torna-se urgente identificar medidas de tratamento mais eficazes para estes tumores. A identificação das alterações moleculares nos PDTC e ATC é muito importante para o desenvolvimento de novas terapias, direccionadas a alvos específicos. Neste sentido, têm sido realizados ensaios clínicos com compostos que afectam múltiplos alvos moleculares. Os alvos que têm sido mais estudados em carcinomas da tiróide, são proteínas com actividade de tirosina cinase, como o EGFR, VEGFR, BRAF e RET. Alguns inibidores destas proteínas são o gefitinib (EGFR),

imatinib (RET), sorafenib (BRAF, VEGFR 1 e 2, RET), vandetanib (VEGFR 2 e 3, RET, EGFR e translocações RET/PTC), pazopanib (VEGFR 1-3), PLX 4032 (BRAF V600E), sunitinib (VEGFR 1-3, RET e rearranjos RET/PTC) (Kapiteijn *et al.*, 2012). Outros alvos moleculares que têm sido testados são as MMP, com o inibidor minociclina, e as desacetilases de histonas, cujo inibidor ácido valpróico potencia o efeito citotóxico da doxorubicina (Legakis e Syrigos, 2011; Taccaliti *et al.*, 2012).

7. Objectivos

No presente projecto de Mestrado pretendeu-se identificar novos alvos terapêuticos para PDTC e ATC. Para a realização deste objectivo efectuou-se uma pesquisa em genes que pudessem estar envolvidos na progressão e desdiferenciação dos carcinomas da tiróide. Foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos:

- Seleccionar genes envolvidos em processos celulares que se encontram desregulados em PDTC e ATC, tendo em conta os resultados obtidos anteriormente no estudo dos níveis de expressão génica global destes tumores;
- Realizar uma extensa pesquisa de mutações nos genes seleccionados: *TP53* (p53), *CTNNB1* (β-catenina), *AXIN1* (Axina-1), *PIK3CA* (PI3K-α), *N- H- e K-RAS* (N-, H- e K-Ras), *BRAF* (B-Raf), *CDKN2A* (p14^{ARF}/p16^{INK4A}), *CDKN2B* (p15^{INK4B}), *CDKN2C* (p18^{INK4C}), *CDKN1A* (p21^{CIP1/WAF1}) e *CDKN1B* (p27^{KIP1}), numa série de PDTC e ATC;
- Estudar os níveis de expressão, em PDTC e ATC, do gene *SNAI2* (Slug), devido ao seu envolvimento na adesão celular, invasão e EMT;
- Correlacionar as alterações genéticas identificadas com os aspectos clínico-patológicos dos doentes.

II. Materiais e Métodos

1. Amostras biológicas

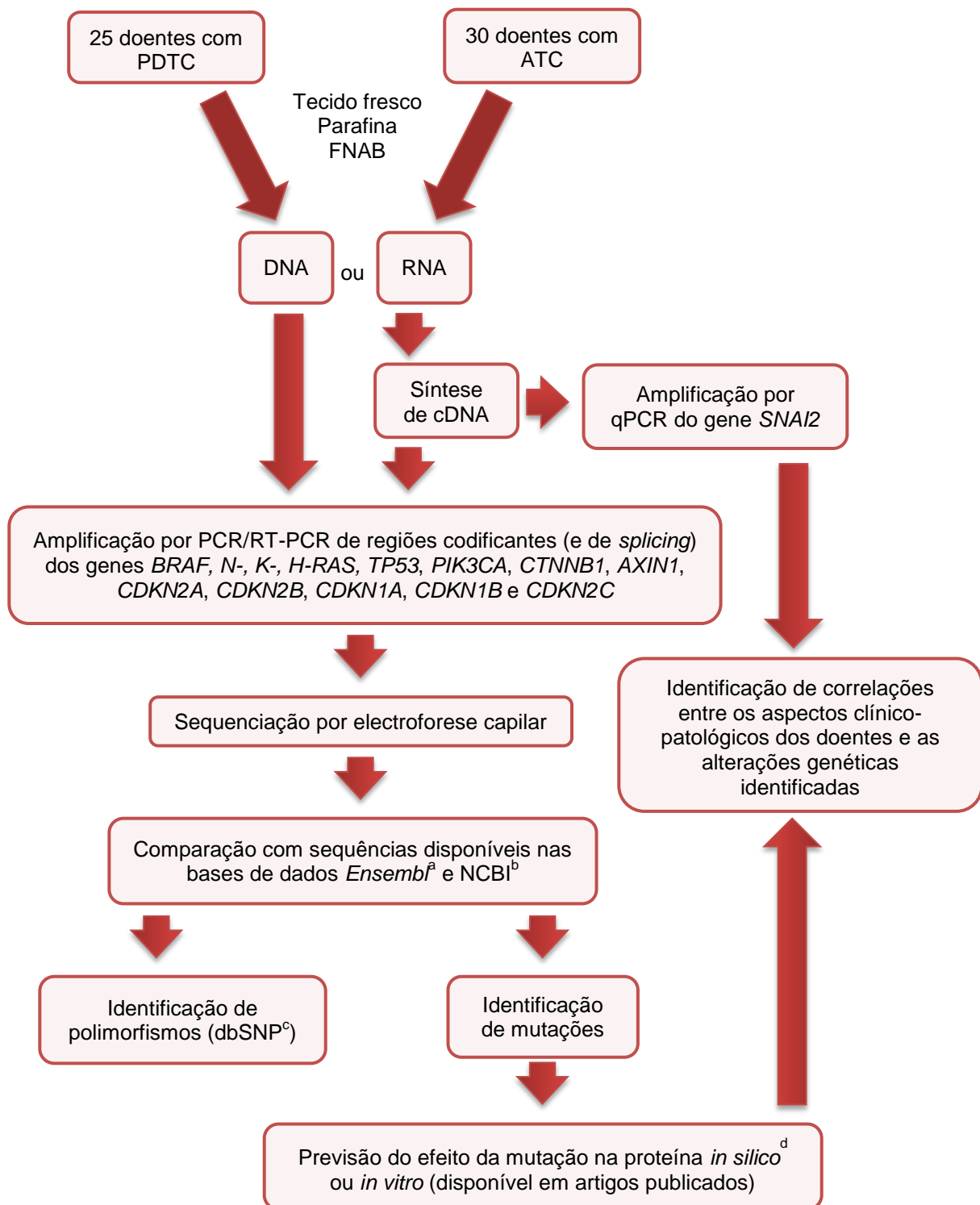
No projecto da presente Tese de Mestrado foram estudadas 30 amostras de ATC (26 tumores primários e 4 linhas celulares), e 25 amostras de PDTC (23 tumores primários e 2 linhas celulares). A recolha das amostras foi realizada com a colaboração do Departamento de Cirurgia (Cirurgia de Cabeça e Pescoço) e do Departamento de Diagnóstico Laboratorial (Anatomia Patológica), do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG).

Biópsias e peças cirúrgicas de tumores da tiróide, e, quando foi possível, tecido normal da tiróide contralateral, foram recolhidos de forma estéril, no bloco operatório do IPOLFG. Os tubos contendo os tecidos foram guardados em azoto líquido imediatamente após a sua colheita.

Foram também recolhidas células de tumores da tiróide, por citologia aspirativa com agulha fina (*Fine Needle Aspiration Biopsy*, ou FNAB). As citologias aspirativas foram recolhidas para um tubo contendo 400 µL de tampão RLT (*RNeasy Mini Kit*, QIAGEN, Alemanha) com 1% (v/v) de beta-mercaptoetanol (β -ME) e guardadas a -70°C até à sua análise.

Foram ainda estudadas amostras de tecidos normais e tumorais da tiróide conservados em parafina. As lâminas correspondentes aos tecidos conservados em parafina foram analisadas por um patologista que seleccionou as áreas de tecido tumoral e de tecido normal.

O fluxograma que se segue resume o trabalho desenvolvido com as amostras biológicas disponíveis:



^awww.ensembl.org;

^b<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>;

^cwww.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP;

^d*Polyphen*

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), *SIFT* (<http://sift.jcvi.org>) e *MutationTaster* (www.mutationtaster.org).

2. Extração de DNA a partir de tecido fresco

Para a extração de DNA a partir das amostras de tecido fresco foi utilizado o *Citogene® DNA Tissue Kit*. Seguiram-se as instruções recomendadas pelo fabricante, com algumas modificações.

Retirou-se a peça tumoral do azoto líquido e transferiu-se para um almofariz esterilizado com azoto líquido. Cortou-se a peça de modo a obter um fragmento de aproximadamente 27 mm³. Guardou-se o restante tecido novamente em azoto líquido para posteriores extracções.

O fragmento do tumor foi triturado, utilizando um bisturi e um pilão estéreis. Adicionaram-se 3 mL de solução de lise celular (*Cell Lysis*) e homogeneizou-se o tumor com esta solução. Transferiu-se a solução para um tubo de 50 mL e incubou-se a 37°C, durante 30 minutos, até a solução ficar homogénea.

Para precipitar as proteínas, adicionou-se ao lisado celular 1 mL de solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation*). Agitou-se vigorosamente no vortex durante 20 segundos, até a solução ficar uniforme, facilitando a agregação das proteínas. De seguida centrifugou-se a 2800 rpm (*ependorf Centrifuge 5810R*, raio do rotor = 180 mm) durante 10 minutos.

Adicionaram-se 3 mL de isopropanol puro a um novo tubo de 50 mL. Após a precipitação das proteínas, transferiu-se o sobrenadante (DNA) para o tubo contendo isopropanol puro. Agitou-se lentamente a solução, por inversão, até aparecer uma “nuvem branca” de DNA. Recolheu-se o DNA com uma ansa estéril e lavou-se em 1 mL de solução de etanol a 70% (v/v). Secou-se o DNA na ansa ao ar. Mergulhou-se a ansa com o DNA, num tubo de 2 mL contendo 150-300 µL de solução de hidratação de DNA (*DNA Hydration*), dependendo da quantidade de DNA. A re-hidratação do DNA efectuou-se por incubação a 65°C, durante 30 minutos.

Guardou-se o DNA a 4°C durante a noite, e quantificou-se a sua concentração no dia seguinte. Para um armazenamento prolongado, guardou-se a solução a -20°C.

3. Extração de DNA a partir de citologias aspirativas com agulha fina (*Fine Needle Aspiration Biopsy*, ou FNAB)

O protocolo seguido para a extração de DNA a partir de FNAB foi semelhante ao da extração de DNA a partir de tecido fresco, com algumas modificações.

Partiu-se de 150 µL de solução de RLT (*RNeasy Mini Kit*, QIAGEN) com β-ME contendo as células obtidas por FNAB, e adicionou-se 450 µL de solução de lise celular. Misturou-se a amostra invertendo 25 vezes e incubou-se a 37°C, durante 1 hora. Deixou-se arrefecer a amostra à temperatura ambiente e adicionou-se 200 µL de solução de precipitação de proteínas. Agitou-se no vortex para uniformizar a amostra. Centrifugou-se a 14000 rpm (*ependorf Centrifuge 5417C*) durante 3 minutos para precipitar as proteínas.

Adicionaram-se 600 µL de isopropanol puro a um novo tubo de 1,5 mL e, após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para este novo tubo. Homogeneizou-se a amostra por inversão e centrifugou-se durante 10 minutos a 14000 rpm, a 4°C (*ependorf Centrifuge 5417R*, raio do rotor = 95 mm). O DNA ficou visível sob a forma de um *pellet* branco. Para facilitar a precipitação do DNA,

para algumas amostras realizou-se um passo adicional, que consistiu na adição de 150-300µL de isopropanol puro, incubação a -70°C e nova centrifugação.

Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se etanol a 70% (v/v) e inverteu-se o tubo várias vezes para lavar o *pellet*. Centrifugou-se a 14000 rpm, durante 5 minutos (*eppendorf Centrifuge 5417C*). Removeu-se o etanol e inverteu-se o tubo sobre papel absorvente durante 10-15 minutos, até o *pellet* se encontrar seco.

Por fim, adicionou-se 50-150 µL de solução de hidratação do DNA e incubou-se a amostra durante 1 hora a 65°C. Armazenou-se a 4°C durante a noite e quantificou-se no dia seguinte. Guardou-se o DNA a -20°C.

4. Extração de DNA a partir de tecidos conservados em parafina

Os tecidos recolhidos durante uma cirurgia são, por norma, fixados numa solução de 4% (v/v) de formaldeído (formalina) e incluídos em parafina. Este processo tem a vantagem de, posteriormente, possibilitar ao patologista uma selecção rigorosa das áreas tumorais e normais de cada amostra, permitindo o seu estudo. No entanto, o formaldeído oxida facilmente a ácido fórmico. Este composto torna o ambiente ácido, levando à degradação do DNA presente nos tecidos fixados (Voet *et al.*, 1999).

O protocolo utilizado para a extração de DNA a partir de tecidos conservados em parafina teve como base o método de Imyanitov e colaboradores (Imyanitov *et al.*, 2001), com algumas modificações. Este método permite a reparação do DNA degradado, utilizando uma reacção catalisada pela Taq polimerase. Utilizando este método é possível completar as cadeias de DNA que se encontram incompletas devido à sua degradação. Deste modo, obtêm-se fragmentos de DNA longos, em vez de fragmentos curtos que poderiam dificultar a amplificação por PCR.

Após a selecção nas respectivas lâminas das áreas de interesse, realizaram-se, em cada amostra incluída em parafina cerca de 3 cortes com a espessura de 10 µm. Colocaram-se os cortes num tubo de 1,5 mL, e adicionaram-se 500 µL de xilol. O xilol é um solvente orgânico que dissolve a parafina, permitindo a sua eliminação dos tecidos. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente no vortex. Centrifugou-se durante 5 minutos a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) e removeu-se o xilol. Repetiu-se a adição do xilol e os passos seguintes.

Adicionaram-se 500 µL de etanol absoluto para remover o xilol e agitou-se ligeiramente, no vortex. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente agitando-se ocasionalmente e centrifugou-se durante 5 minutos a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*). Repetiu-se a adição de etanol e os passos seguintes, mas centrifugando apenas durante 2 minutos. Procedeu-se então à secagem das amostras de tecido no *Speed Vacuum* (UNIVAPO 100H UNQUIP/*Aspirator Refrigerated UNIGET II*, Canadá), durante 5-10 minutos, para evaporar todo o etanol presente. Adicionou-se 500 µL de solução de hidratação de DNA (*Citogene® DNA Tissue Kit*).

De seguida, procedeu-se à permeabilização dos tecidos, para posterior reparação do DNA. Para tal, adicionaram-se 2 µL de proteinase K (5 mg/mL, *Promega*, EUA) e incubou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente. A proteinase K é uma protease de serina que hidrolisa as ligações

peptídicas na extremidade carboxilo de resíduos de aminoácidos alifáticos, aromáticos e hidrofóbicos, permitindo a degradação do tecido e dos restantes componentes celulares proteicos. Posteriormente centrifugou-se durante 3 minutos a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) e removeu-se o sobrenadante. Seguiram-se 3 lavagens com 500 µL de solução de hidratação de DNA (*Citogene® DNA Tissue Kit*) intercaladas com centrifugações durante 3 minutos a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*).

Preparou-se uma mistura de recuperação de DNA contendo: 100 µL de solução tamponada de PCR 10x concentrada (*Invitrogen™*), 30 µL de MgCl₂ a 50 mM (*Invitrogen™*), 50 µL do detergente W-1 a 1% (v/v) (*Invitrogen™*), 80 µL de dNTPs a 2,5 mM (*Invitrogen™*) e fez-se o volume de 1000 µL com H₂O destilada estéril. Adicionou-se 100 µL da mistura reaccional ao tubo com o DNA e agitou-se no vortex.

Incubou-se a 55°C durante 1 hora para solubilizar parcialmente o tecido.

Adicionou-se 2 µL de polimerase de DNA a 5 U/µL (*Invitrogen™*) e incubou-se a 72°C durante 20 minutos. Agitou-se ligeiramente no vortex e incubou-se a 100°C para ferver durante 7 minutos, de forma a solubilizar e desintegrar os componentes do tecido. Guardou-se a solução a -20°C durante a noite.

No dia seguinte, descongelou-se a amostra em gelo, e adicionou-se 2,5 µL de proteinase K a 20 mg/mL. Incubou-se a 60°C durante 3 horas, agitando-se ocasionalmente no vortex.

Após as 3 horas, adicionaram-se 100 µL de resina quelante Chelex e agitou-se durante 15 minutos no vortex.

Ferveu-se a amostra a 100°C em banho seco durante 10 minutos para inactivar a proteinase K. Por fim, centrifugou-se a 11500 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante para outro tubo de 2 mL e repetiu-se a centrifugação a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 5 minutos para eliminar totalmente o Chelex.

Para quantificação e controlo da qualidade do DNA genómico extraído dos vários tipos de amostras recorreu-se a uma electroforese em gel de agarose a 2% (p/v). Guardou-se o DNA a -20°C.

5. Extracção de RNA a partir de tecido fresco

Para a extracção de RNA a partir das amostras de tecido, utilizou-se o kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN). Este método utiliza soluções com sais de guanidina (como os tampões RLT e RW1) no fraccionamento e homogeneização da amostra. Estas soluções são fortes desnaturantes que inibem a acção das ribonucleases (RNases) endógenas, impedido a degradação do RNA. A contaminação por RNases é ainda evitada pelo uso de soluções e materiais tratados com inibidores específicos de RNases (como o dietilpirocarbonato, ou DEPC) e pelo uso de materiais descartáveis e esterilizados (Sambrook e Russell, 2001).

O protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações.

Fragmentou-se o tecido tumoral, como descrito na secção II.3, tendo o cuidado de que a peça de tecido não descongelasse, para evitar a degradação do RNA. Adicionou-se 600 µL de tampão RLT com β-ME 1% (v/v) e homogeneizou-se o tumor com esta solução. Estes reagentes lisam as células e inibem as RNases endógenas. Transferiu-se a solução para um tubo de 2 mL. Adicionou-se mais 100

µL de solução de tampão RLT com β-ME ao almofariz, para remover completamente o lisado, e transferiu-se para o tubo. Homogeneizou-se a solução, com uma seringa com agulha de 20 G, para promover a degradação de DNA que poderia interferir nos passos seguintes.

Centrifugou-se a solução durante 5 minutos, a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95 mm), e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL. Adicionou-se igual volume (700 µL) de solução de etanol a 70% (v/v), em H₂O tratada com DEPC. Homogeneizou-se, invertendo o tubo suavemente.

Transferiu-se a solução (no máximo 700 µL, repetindo o procedimento para o volume restante) para uma coluna com uma membrana de sílica-gel (que permite a remoção do DNA) colocada num tubo de 2 mL. Aguardou-se durante 2 minutos e procedeu-se à centrifugação durante 30 segundos a 10000 rpm. Aplicou-se novamente o eluído, na mesma coluna, de forma a obter um maior rendimento. Esperou-se 1 minuto, e centrifugou-se nas mesmas condições.

Desprezou-se o eluído, e adicionaram-se 700 µL de tampão RW1 à coluna. Centrifugou-se durante 30 segundos, a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*), desprezou-se o eluído e transferiu-se a coluna para um novo tubo de 2 mL. De seguida, adicionaram-se 500 µL de tampão RPE à coluna. Centrifugou-se durante 30 segundos, a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*), para lavar a coluna e rejeitou-se o eluído. Voltou-se a adicionar 500 µL de tampão RPE, e centrifugou-se durante 2 minutos, a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*), para secar a membrana de sílica-gel da coluna. Desprezou-se o eluído e centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) para garantir a secagem da membrana.

Transferiu-se a coluna para um tubo de 1,5 mL e adicionaram-se 30-50 µL de H₂O RNase-free, directamente na membrana de sílica-gel, para eluir o RNA. Aguardou-se 5-10 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto a 11000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*). Para obter uma maior concentração de RNA, foi realizada uma segunda eluição utilizando o primeiro eluído. Guardou-se o RNA a -70°C.

6. Extracção de RNA a partir de FNAB

O protocolo seguido para extracção de RNA de células provenientes da FNAB foi idêntico ao utilizado na extracção de RNA a partir de tecido fresco (secção II.5), no entanto, utilizou-se um volume inicial de RLT (*RNeasy Mini Kit*, QIAGEN) com β-ME de 400 µL para a colheita celular (secção II.1). Guardou-se o RNA a -70°C.

7. Quantificação espectrofotométrica de DNA e RNA

Para a quantificação da concentração do DNA e RNA, recorreu-se ao doseamento espectrofotométrico. Este método utiliza a Lei de Lambert-Beer, que enuncia que, em condições ideais, a concentração de uma substância é directamente proporcional à radiação absorvida por esta, num comprimento de onda e espessura de material, específicos.

Por espectrofotometria, quantificou-se a radiação ultravioleta (UV) absorvida pelas bases nucleotídicas das cadeias dos ácidos nucleicos. As leituras foram efectuadas a 260 e 280 nm (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*, EUA), que são os comprimentos de onda correspondentes aos

máximos de absorção dos ácidos nucleicos e das proteínas, respectivamente. Para avaliar o grau de pureza dos ácidos nucleicos, calculou-se a razão entre as absorvências do DNA ou do RNA, e a absorvência das proteínas, sendo, em ambos os casos, 1,8 – 2,1 considerados valores aceitáveis para uma amostra pura. Os valores inferiores a este intervalo podem indicar contaminação por proteínas, e os valores superiores, a presença de ácidos nucleicos degradados e /ou excesso de nucleótidos livres.

A quantificação da concentração dos ácidos nucleicos é efectuada, considerando que uma unidade de absorvência de UV, ao comprimento de onda de 260 nm, corresponde a 50 µg/mL de DNA e 40 µg/mL de RNA, numa solução de 1 centímetro de espessura (Sambrook e Russell, 2001). Deste modo, é possível determinar a concentração de DNA ou RNA de cada amostra, tendo em conta o factor de diluição, segundo as seguintes relações:

- $[\text{DNA}]_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \times 50 \times \text{factor de diluição};$
- $[\text{RNA}]_{\mu\text{g/mL}} = A_{260} \times 40 \times \text{factor de diluição}.$

8. Síntese de cDNA por transcrição reversa de RNA

Nas reacções de transcrição reversa utiliza-se a enzima transcriptase reversa (RT), uma polimerase de DNA dependente de RNA, para sintetizar cDNA a partir de mRNA. Para a síntese de cDNA utilizaram-se *primers* aleatórios (*random primers*) que hibridam com os mRNAs presentes nas soluções de RNA total purificado. Posteriormente, é possível amplificar as cadeias de cDNA por RT-PCR (secção II.9).

Na síntese de cDNA, utilizou-se o volume correspondente a 1 µg de RNA, ao qual se adicionou 1 µL de *random primers* (*Invitrogen*TM) e H₂O-DEPC para perfazer um volume de 9,5 µL. Esta solução foi incubada a 70°C durante 10 minutos a fim de desnaturar as ligações intramoleculares do mRNA. De seguida, com o tubo em gelo, adicionou-se solução tamponada *1st strand* pH 8,3 1x concentrada (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂; *Invitrogen*TM), 0,5 mM de dNTPs-DEPC (*Invitrogen*TM), 10 mM de ditiotretol (DTT; *Invitrogen*TM), 20 U de inibidor de RNases (RNase Out; *Invitrogen*TM) e 200 U de Transcriptase Reversa SuperScript II RT (*Invitrogen*TM), perfazendo o volume final de 21 µL.

Incubou-se a reacção a 37°C durante 1h30 para síntese do cDNA, e de seguida a 95°C durante 5 minutos para inactivar as enzimas da reacção. O cDNA sintetizado foi guardado a -20°C.

9. Amplificação de DNA/cDNA por PCR/RT-PCR

A técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para amplificar *in vitro*, regiões específicas do DNA, ou do DNA complementar (cDNA) (RT-PCR).

As reacções de PCR realizadas durante este trabalho foram preparadas num volume final de 25 µL, contendo: 50 ng de DNA, 1,2 a 2 mM de MgCl₂ (concentração otimizada para cada reacção; *Invitrogen*TM, *Life Technologies*, EUA; *Bioline*TM, Reino Unido), solução tamponada de PCR 1x concentrada (*Invitrogen*TM; *Bioline*TM), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs; *Invitrogen*TM), 10 pmol de *primer forward* (cadeia *sense*) e de *primer reverse* (cadeia anti-*sense*) (*Invitrogen*TM; *Sigma*-

Aldrich, EUA), 1 U de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen™; Bioline™) e água destilada estéril para perfazer o volume final. Em algumas reacções foi necessário adicionar dimetilsulfóxido (DMSO) 3-6% (v/v), ou formamida Hi-Di 2% (v/v) (Applied Biosystems, EUA) e BSA (1x concentrado; New England Biolabs, Reino Unido) para aumentar o rendimento e especificidade da reacção.

As reacções de RT-PCR foram realizadas com a mesma composição, mas utilizando 1 µL (~ 50 ng) de cDNA.

Para todas as reacções foi preparado simultaneamente um controlo negativo, constituído por uma mistura dos reagentes de PCR, contendo água em substituição do DNA, para detectar a presença de possíveis contaminações na reacção.

As reacções foram processadas num termociclador (Biometra, Alemanha) e consistiram numa desnaturação inicial do DNA durante 5 minutos, seguindo-se 35-40 ciclos de amplificação. Cada ciclo compreendeu uma fase de desnaturação do DNA durante 45 segundos a 1 minuto, uma fase de hibridação dos *primers* com o DNA à temperatura de *annealing* de 56-61°C (dependendo das condições óptimas para cada reacção) durante 35 segundos a 1 minuto, e uma fase de extensão das novas cadeias a 72°C durante 40 a 80 segundos. Para amostras com DNA mais degradado, como as amostras provenientes de tecidos conservados em parafina, realizaram-se ciclos com maior duração para facilitar a amplificação do DNA. Após os ciclos de amplificação procedeu-se a uma extensão final a 72°C, durante 10 minutos.

As condições das reacções de PCR foram optimizadas para cada par de *primers*. Testaram-se vários graus de estrigência, combinando diversas concentrações de MgCl₂ com diferentes temperaturas de *annealing*.

A concentração de MgCl₂ influencia a especificidade e eficiência de cada reacção de PCR. Os iões Mg²⁺ formam um complexo solúvel com os dNTPs, essencial para a sua incorporação durante a reacção. Para além disso, facilitam a interacção entre os *primers* e as cadeias de DNA molde, e funcionam como co-factor da enzima *Taq* polimerase. Desta forma, uma quantidade insuficiente de MgCl₂, diminui o rendimento da reacção, podendo inclusivamente não ocorrer. Por outro lado, um excesso de MgCl₂ pode originar produtos inespecíficos. O aumento da concentração de MgCl₂ numa reacção de PCR pode permitir um aumento no rendimento de amplificações de amostras com DNA degradado, facilitando a hibridação dos *primers* e a síntese de novas cadeias a partir de um menor número de cadeias molde intactas.

A temperatura de *annealing* é o outro factor crítico na eficiência e especificidade das reacções de amplificação por PCR. A sua optimização permite determinar qual a temperatura em que a hibridação dos *primers* com o DNA alvo é máxima. Temperaturas elevadas aumentam a especificidade das reacções, prevenindo a hibridação dos *primers* com regiões inespecíficas. Por outro lado, a diminuição da temperatura de *annealing* facilita a hibridação dos *primers*, que ocorre mais frequentemente em regiões inespecíficas, favorecendo a amplificação de produtos não desejados.

De um modo geral, para a optimização das reacções de PCR utilizaram-se duas concentrações de MgCl₂ (1,2 e 1,8 mM) e duas temperaturas de *annealing* (56 e 58°C). Por fim, seleccionaram-se as condições de PCR mais adequadas a cada par de *primers*, de forma a obter o máximo de eficiência e especificidade em cada reacção (Anexos I, II e III).

Para algumas reacções foi necessário adicionar DMSO ou formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*) e BSA para aumentar o rendimento e especificidade da reacção ou formamida e BSA, em diferentes concentrações, que também foram optimizadas para cada reacção.

Para a maioria das amostras de PDTTC e ATC recolhidas por FNAB extraiu-se apenas RNA, e utilizaram-se primers exónicos para amplificação dos diferentes genes a partir do cDNA. Para os genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN1A*, *CDKN1B* e *AXIN1*, os *primers* disponíveis eram intrónicos, e foram apenas utilizados para a amplificação de DNA, não sendo possível utilizá-los para amplificação de cDNA. Não foi possível amplificar o DNA/cDNA de algumas amostras (Anexo IV).

10. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é utilizado para quantificar a expressão de um determinado gene em diferentes amostras.

Uma reacção de PCR possui três fases distintas: a fase exponencial durante a qual ocorre a duplicação do ácido nucleico em cada ciclo, em reacções 100% eficientes; a fase linear na qual a taxa de amplificação decresce um pouco, devido ao consumo dos reagentes durante a fase exponencial; e a fase *plateau* na qual a reacção de amplificação termina. A principal diferença entre o PCR convencional e o qPCR é que o qPCR torna possível determinar a quantidade de ácido nucleico durante a fase exponencial, enquanto que o PCR convencional apenas permite determinar a quantidade final de ácido nucleico, na fase *plateau*. Desta forma, com o qPCR é possível determinar a quantidade inicial, relativa ou absoluta, do ácido nucleico.

Para a quantificação dos níveis de expressão de um gene, é necessário definir o valor de *threshold*. O *threshold* é o nível arbitrário de fluorescência produzida pela reacção que é possível distinguir do *background*, e que ocorre durante a fase exponencial, geralmente entre o 3º e o 15º ciclo. O ciclo de *threshold* (Ct) é definido como o número de ciclos do PCR em que cada amostra atinge o *threshold*. Este valor é utilizado na quantificação absoluta, ou relativa de ácido nucleico. Se um gene tem maior expressão, atingirá o *threshold* mais rapidamente do que um gene que é menos expresso. Assim, as amostras nas quais o gene em estudo tem uma expressão aumentada terão Ct menores do que amostras que tenham menor expressão do mesmo gene.

Existem dois métodos de detecção utilizados em qPCR: *TaqMan®* e *SYBR® Green* (*Applied Biosystems*). Neste trabalho utilizou-se o método baseado nas sondas *TaqMan®*.

As sondas *TaqMan®* têm uma especificidade elevada, pois contêm um oligonucleótido, que hibrida especificamente com uma sequência do gene que se pretende estudar, ligado a um fluorocromo *reporter* (neste trabalho utilizou-se o fluorocromo *FAM™*) na extremidade 5' e um *quencher* sem fluorescência

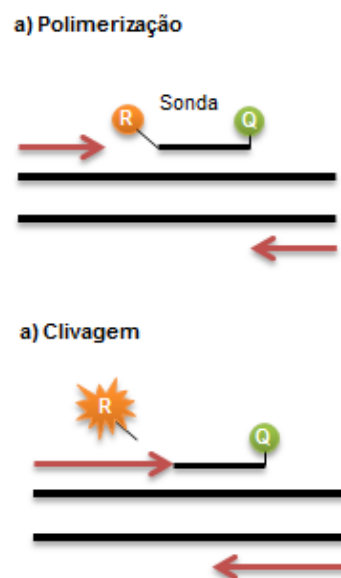


Figura II.1 - Amplificação com sondas *TaqMan®*. A preto estão representados fragmentos de DNA. A vermelho estão representados os *primers*. R – Reporter; Q – Quencher.

(*nonfluorescent quencher*, ou NFQ) na extremidade 3'. Quando ligado à sonda, o fluorocromo *reporter* encontra-se suficientemente próximo do *quencher*, para que este reduza a sua emissão de fluorescência. Na fase de extensão, a *Taq* polimerase, que tem actividade de nuclease 3'-5', cliva o fluorocromo *reporter* que se encontra na região 5' da sonda, afastando-o do *quencher* (Figura II.1). Desta forma, a amplificação prossegue e a fluorescência do repórter é emitida e detectada pelo aparelho de qPCR. A fluorescência emitida é proporcional à quantidade de produto de PCR.

A quantificação relativa é usada para analisar variações na expressão génica numa dada amostra, em relação a uma outra amostra (ou *pools* de amostras) de referência, designada por calibrador. A quantidade de ácido nucleico alvo em cada amostra é expressa relativamente à quantidade presente no calibrador.

No método da curva-padrão, constrói-se uma curva de calibração, uma relação linear entre o Ct e o logaritmo da quantidade inicial de ácido nucleico alvo na amostra padrão. Para tal, utiliza-se uma série de diluições de uma amostra de concentração conhecida, e que expressa o gene em estudo. Para corrigir variações nas quantidades de RNA em cada amostra, e nas eficiências de transcrição reversa e PCR, amplifica-se em paralelo um controlo endógeno, para todas as amostras. O controlo endógeno é um segmento de mRNA que se encontra presente em todas as amostras em estudo, em quantidade aproximadamente constante e que não é afectada pelo procedimento experimental. Geralmente, selecciona-se um gene constitutivo (*housekeeping*). Desta forma, a quantidade de ácido nucleico alvo é normalizada, dividindo a quantidade obtida para o gene em estudo, pela quantidade de referência endógena (Ct/quantidade). Por fim, obtêm-se os valores de expressão relativa, dividindo cada valor normalizado para cada amostra, pelo valor do calibrador.

O molde para a amplificação por qPCR são cadeias de cDNA, sintetizado a partir de RNA purificado de cada amostra (secção II.8).

Neste trabalho, utilizou-se o qPCR para quantificar os níveis de expressão do gene *SNAI2* (codifica a proteína Slug envolvida na adesão celular; ver secção I.5.1.2.2) nas amostras de PDTc e ATC. O gene *ACTB* (codifica a β -actina) foi utilizado como gene *housekeeping*. Na construção da curva de calibração do gene *SNAI2*, utilizou-se uma amostra de ATC com expressão elevada do gene, diluída em 4 concentrações (2000; 200; 20 e 2 ng). A curva de calibração do gene *ACTB* foi construída a partir de uma *pool* de controlos normais comercial, diluída em 4 concentrações (1000; 125; 15,6 e 1,9 ng). As quantidades mencionadas são relativas à quantidade de RNA utilizado na síntese de cDNA. Para cada gene, foi incluído um controlo negativo, sem cDNA (NTC – *non-template control*). Todas as amplificações por qPCR foram realizadas em triplicado, em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-well reaction plate*, *Applied Biosystems*).

As reacções de *Taqman* foram executadas seguindo o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*). Preparou-se uma diluição de 1:8 do cDNA de cada amostra com H₂O destilada estéril, que foi usada para a reacção de qPCR. O valor desta diluição foi previamente testado, e permitiu manter os valores de Ct das amostras razoáveis, e entre os valores abrangidos pelas curvas de calibração. Para além disso, a diluição do cDNA foi importante também, para diluir os reagentes utilizados para a síntese de cDNA, que poderiam interferir na reacção de qPCR.

Para cada amostra preparou-se, em gelo, a seguinte reacção para um volume final de 20 µl: 2 µL da diluição do cDNA da amostra, 1 µL de sonda TaqMan (*Gene Expression Assay; Applied Biosystems*) 20x concentrada, para cada gene, 10 µL de Master Mix de PCR TaqMan 2x concentrada (*Applied Biosystems*), 7 µL de H₂O destilada estéril até perfazer o volume final.

As reacções foram iniciadas com uma desnaturação a 95°C durante 10 minutos, que foi seguida de 45 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu numa fase de desnaturação, durante 15 segundos a 95°C e uma fase de *annealing* e extensão a 60°C durante 1 minuto. Os qPCR foram realizados no *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)*, monitorizado através do *software SDS (Applied Biosystems)*, no qual também foi efectuada a análise dos resultados.

Os qPCR realizados neste trabalho foram executados com a colaboração do Dr. Jaime Pita, do nosso grupo.

11. Electroforese dos produtos de PCR em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose separa os fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular. A electroforese em gel de agarose foi utilizada para determinar se a amplificação do DNA por PCR ocorreu com sucesso e para isolar produtos de PCR para sequenciação. Neste trabalho, utilizaram-se géis de agarose a 2% (p/v), para separar fragmentos entre 100-500 pares de bases (bp). A quantidade de agarose necessária foi dissolvida em solução tamponada TBE 1x concentrada, pH 8,0 (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e aqueceu-se até à ebulição para dissolução completa. Na câmara de tóxicos, adicionou-se a quantidade de brometo de etídio necessária para uma concentração final de 0,5 µg/mL, e verteu-se para o molde, previamente preparado com os pentes necessários. Aguardou-se a polimerização do gel, e de seguida colocou-se numa tina de electroforese horizontal com solução tamponada TBE 1x concentrada, pH 8,0, de forma a cobrir o gel.

Aplicou-se 2,5-5 µL de cada produto de PCR, juntamente com solução de deposição a 1x (*DNA loading dye 6x; Fermentas, EUA*) nos poços do gel. Aplicou-se simultaneamente 1 µL de um marcador de peso molecular (pUC 8, *Fermentas*) noutro poço. Os marcadores de peso molecular contêm vários fragmentos de DNA com pesos moleculares diferentes e conhecidos. Estes marcadores, quando aplicados simultaneamente com produtos de PCR com pesos moleculares desconhecidos, permitem estimar o seu peso molecular. Desta forma, é possível determinar se o produto de PCR obtido corresponde ao pretendido.

As corridas electroforéticas decorreram sob uma diferença de potencial constante de cerca de 130 V, durante 30 a 40 minutos.

Para visualizar as bandas que resultaram da electroforese, colocou-se o gel num transiluminador acoplado a uma câmara de vídeo e a um sistema informático (*BioDocAnalyze, Biometra, Alemanha*), onde foi exposto a radiação UV ($\lambda=300$ nm).

12. Sequenciação automática

A polimerase de DNA sintetiza cadeias simples de DNA, complementares a cadeias molde, catalisando a ligação fosfodiéster entre o grupo 3' hidroxilo livre do *primer* e o grupo 5' fosfato do 2'-desoxinucleótido (dNTP) seguinte (Sanger *et al.*, 1977). Nas reacções de sequenciação realizadas neste trabalho, a síntese de DNA pela polimerase de DNA, ocorreu na presença de um dos *primers* (*forward ou reverse*), dos dNTPs e de análogos dos dNTPs, os 2',3'-didesoxinucleótidos trifosfatados (ddNTPs), que não possuem o grupo hidroxilo no carbono 3' e estavam marcados com diferentes fluorescências. Durante a síntese de DNA, por vezes são incorporados ddNTPs em vez de dNTPs, o que induz a terminação prematura da síntese da cadeia, devido à ausência do grupo 3' hidroxilo, necessário para a nova ligação. No final da reacção, existem várias cadeias simples de DNA, com diferentes tamanhos, marcadas com o fluorocromo do ddNTP que foi incorporado aleatoriamente terminando a extensão (Figura II.2).

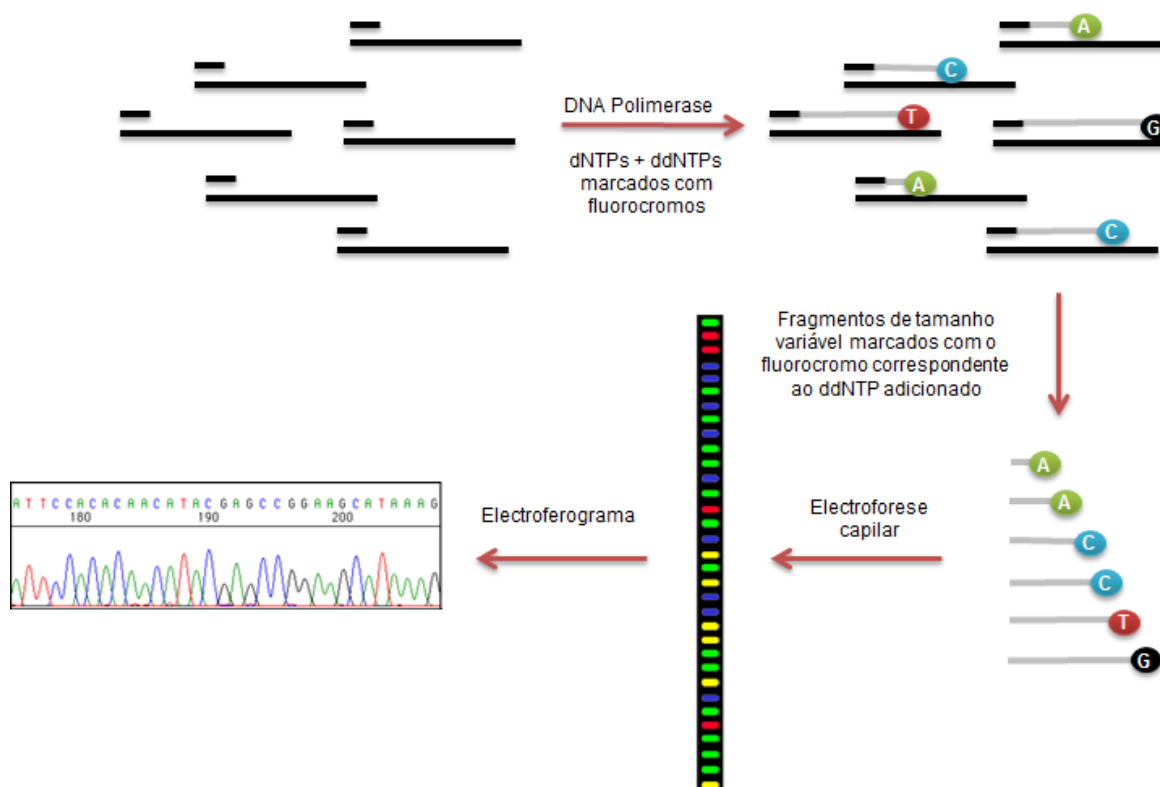


Figura II.2 - Sequenciação de DNA por electroforese capilar (Adaptado de www3.appliedbiosystems.com).

Os fragmentos de DNA sintetizados podem ser separados por electroforese capilar, de acordo com o seu tamanho. Durante a separação, os fragmentos de DNA vão sendo atingidos por um feixe de *laser*, e o sinal de fluorescência correspondente a cada ddNTP é detectado. Desta forma, podem ser identificadas as sequências das diferentes bases nos segmentos de DNA amplificados por PCR.

12.1. Purificação directa dos produtos de PCR

Quando os produtos das reacções de PCR não possuíam inespecificidades, utilizou-se um método enzimático para os purificar. Utilizou-se uma mistura de duas enzimas (*Fermentas*, EUA): 10 U de *Exonuclease I* (*Exo I*) e 1 U de *FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase* por cada 10 µL de produto de PCR. Estas enzimas degradam os *primers* e os nucleótidos não incorporados durante a síntese de DNA, que poderão interferir com a reacção de sequenciação e electroforese capilar. A reacção enzimática ocorreu num termociclador (*T3 thermocycler*, *Biometra*) durante 15 minutos a 37°C. Para parar a reacção e inactivar as enzimas, seguiu-se um passo de 15 minutos a 85°C. Os produtos purificados foram armazenados a -20°C.

12.2. Purificação de bandas excisadas de gel de agarose

Na presença de produtos inespecíficos no produto de PCR, utilizou-se um método de purificação do DNA, a partir de bandas excisadas do gel de agarose. Neste método, aplicou-se todo o produto de PCR num gel de agarose, juntamente com solução de deposição a 1x. De seguida, num transiluminador, sob radiação UV, excisou-se a banda com o tamanho correspondente ao produto pretendido. Colocou-se num tubo de 2 mL e guardou-se a 4°C.

Para a purificação do produto utilizou-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (*Amersham Bioscience*, *GE Healthcare*, EUA). Ao tubo com a banda excisada adicionaram-se 500 µL de solução de captura (*capture buffer*) que desnatura as proteínas e promove a ligação do DNA à matriz da coluna. Agitou-se vigorosamente no vortex e incubou-se a 60°C até a agarose estar completamente dissolvida. Entretanto, colocou-se uma coluna GFX num tubo colector, fornecidos pelo fabricante. Após a dissolução da agarose, transferiu-se a solução para a coluna e centrifugou-se durante 30 segundos, a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*). Desprezou-se o eluído e adicionaram-se 500 µL de solução de lavagem (*wash buffer*) à coluna. Esta solução possui etanol absoluto e remove os sais e contaminantes da matriz da coluna. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e desprezou-se o eluído. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e aplicaram-se entre 30-50 µL de tampão de eluição (*elution buffer type 6*) dependendo da intensidade da banda excisada no gel. Aguardou-se durante 2 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto a 14000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) para recuperar o produto de PCR purificado.

Para avaliar visualmente a intensidade do produto purificado, aplicaram-se estes produtos num gel de agarose, tal como descrito na secção 11 do presente capítulo. Os produtos de PCR purificados foram armazenados a -20°C.

12.3. Reacções de sequenciação

Para a realização das reacções de sequenciação seguiu-se o protocolo do *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*. Para cada reacção utilizaram-se os seguintes reagentes: solução tamponada 1x concentrada (*Sequencing Buffer*), 3,2 pmol de *primer forward* ou *primer reverse*, 1-1,5 µL de Big Dye (para produtos até 300-400 bp) e 10 ng, ou mais, de produto de PCR purificado, dependendo do rendimento da reacção. Por fim, adicionou-se H₂O destilada estéril até perfazer o volume final de 20 µL.

As reacções ocorreram num termociclador (*T3 thermocycles, Biometra*), com uma desnaturação inicial de 3 minutos a 96°C, seguida de 25 ciclos de amplificação. Cada ciclo compreendeu uma fase de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, uma fase de hibridação do *primer* à temperatura de *annealing* de 50°C, durante 5 segundos, e uma fase de extensão a 60°C durante 4 minutos. No final, guardaram-se os produtos das reacções de sequenciação a 4°C.

12.4. Precipitação dos produtos da reacção de sequenciação

Durante a reacção de sequenciação, existem ddNTPs que não são incorporados, e que podem interferir na interpretação dos resultados da sequenciação. Como tal, é necessário removê-los antes da análise por electroforese capilar. Para a purificação das reacções de sequenciação seguiu-se o protocolo *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*.

Para cada reacção, adicionou-se num tubo de 1,5 mL, 50 µL de etanol absoluto, 2 µL de EDTA 125 mM pH 8,0 e 2 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,6. O EDTA inibe a actividade da enzima da reacção de sequenciação e o acetato de sódio e o etanol absoluto diminuem a solubilidade do DNA, favorecendo a sua precipitação. À mistura, juntou-se o produto da reacção de sequenciação e agitou-se no vortex. Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente, e de seguida centrifugou-se a 14000 rpm durante cerca de 40 minutos, a 4°C (*ependorf Centrifuge 5417R*). A baixa temperatura favorece a precipitação dos produtos da reacção de sequenciação.

Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de etanol a 70%, para remover os sais acumulados. Agitou-se rapidamente no vortex, e centrifugou-se novamente nas mesmas condições durante 15 minutos. Por fim, removeu-se por completo o sobrenadante e secou-se o *pellet* a 37°C. Os *pellets* secos foram guardados a 4°C até se proceder à sua sequenciação.

12.5. Electroforese capilar dos produtos de PCR

Os *pellets* obtidos na precipitação dos produtos das reacções de sequenciação foram ressuspendidos em 15 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*). Agitou-se vigorosamente no vortex e transferiram-se as amostras para uma placa de 96 poços (*Platemax, Axygen, EUA*). Desnaturou-se a placa durante 10 minutos a 95°C, e colocou-se em gelo durante 5 minutos. De seguida, centrifugou-se durante 1-2 minutos a 1100-1200 rpm (*ependorf Centrifuge 5810R*). A placa contendo as amostras para sequenciar, foi colocada no sequenciador automático *ABI Prism™ 3130*

Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As amostras foram submetidas a electroforese capilar durante cerca de 30 minutos.

Os sinais de fluorescência detectados pelo sequenciador, foram convertidos em electroferogramas através do *software Sequencing Analysis 3.4.1 (Applied Biosystems)*. Os electroferogramas obtidos para cada amostra representam a sequência do DNA analisado.

12.5.1. Análise de sequências

Para análise das sequências obtidas, utilizou-se o *software Variant Reporter v1.0 (Applied Biosystems)*. Neste programa foi possível comparar as sequências obtidas com as sequências referência que foram atribuídas a cada amostra. As sequências de referência foram obtidas a partir da base de dados *Ensembl* (www.ensembl.org).

12.5.2. Análise do efeito funcional das variantes identificadas

Para caracterizar as diferentes variantes genéticas não-sinónimas identificadas, consultaram-se diferentes bases de dados. Na base de dados de SNPs dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) foi possível identificar os polimorfismos, ou seja variantes genéticas que apresentavam uma frequência > 1% na população. Quando a variante não estava descrita na dbSNP, consultaram-se bases de dados de mutações: *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)* e *The Human Gene Mutation Database (HGMD)* (<http://www.hgmd.org/>) e *Ensembl*.

Quando se tratava de uma variante genética nova, para prever o seu impacto na estrutura e função da proteína e esclarecer o seu possível papel (benigno vs patogénico), procedeu-se à análise da mesma, utilizando 3 ferramentas informáticas: *Polyphen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), *SIFT* (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) e *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org>). Utilizando o *software Polyphen* é possível prever o efeito que a substituição de um resíduo de aminoácido por outro, tem na estrutura e função da proteína. Para cada substituição, o *software* adquire várias informações sobre a sequência e estrutura do sítio onde ocorre a substituição, e realiza operações estatísticas que permitem obter a probabilidade de a substituição de resíduo de aminoácido ter um efeito patogénico ou benigno. A previsão realizada por este *software* baseia-se na informação existente sobre a estrutura e filogenética da sequência da proteína afectada. Os resíduos de aminoácidos importantes para o funcionamento de uma proteína, são conservados ao longo da evolução. Os resíduos de aminoácidos localizados em regiões que não são relevantes para a manutenção do funcionamento da proteína, podem variar, não tendo qualquer efeito patogénico.

O *software SIFT* utiliza o alinhamento múltiplo de sequências semelhantes, que possam partilhar funções com a sequência em estudo. Após efectuar o alinhamento das sequências, o *software* calcula a probabilidade de uma substituição de resíduo de aminoácido ter um efeito patogénico na proteína, ou, por outro lado, ser tolerada. A análise realizada pelo *software SIFT* é baseada apenas no grau de conservação dos resíduos de aminoácidos entre espécies.

O software *MutationTaster* (Schwarz *et al.*, 2010) realiza uma análise global da conservação, localização e estrutura no local da substituição em causa, tal como o *Polyphen*. No entanto, ao contrário dos outros programas, este permite prever o efeito de inserções e deleções até 12 bp, e possíveis alterações de locais de *splicing*. Tal como os outros programas, fornece uma previsão global do efeito da alteração genética em causa (patogénica vs benigna), baseada numa análise estatística.

Após ter sido efectuada a previsão do efeito funcional da alteração genética em questão, analisou-se ainda, quando disponível, o tecido normal constitucional do doente, para determinar a origem somática ou germinal da variante genética. A origem somática da variante, sugeriu um envolvimento no desenvolvimento tumoral.

13. Análise estatística

Para analisar dados categóricos, foi utilizado o teste exacto de *Fisher*, em tabelas de contingência 2x2.

Para determinar qual o teste a utilizar na análise de dados numéricos, testou-se a sua normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para dados com distribuição normal (Gaussiana) e igualdade de variâncias foi utilizado o teste paramétrico *t-Student* para comparar dois grupos, ou o teste paramétrico *one-way ANOVA*, com *post-test* de Tukey, para 3 ou mais grupos. Para efectuar a análise de dados que apresentavam diferenças significativas entre as variâncias, foi utilizada a correcção de *Welch* ao teste *t-Student*. Esta correcção torna possível o uso do teste *t-Student* em dados com diferenças significativas entre variâncias, uma vez que não assume igualdade nas variâncias. Para efectuar a análise de dados que não apresentavam distribuição normal utilizaram-se os testes não paramétricos Mann-Whitney (2 grupos) ou Kruskal-Wallis (> 2 grupos).

Para a construção de curvas de sobrevivência utilizou-se o método de *Kaplan-Meier*, seguido do teste estatístico *Log-rank*.

Os dados foram analisados utilizando o software estatístico *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software*, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

III. Resultados

1. Aspectos clínico-patológicos dos doentes

Os aspectos clínico-patológicos dos doentes com PDTC e ATC, relevantes para o presente estudo, estão descritos na Tabela III.1.

Tabela III.1 – Aspectos clínico-patológicos dos doentes com PDTC e ATC.

Amostra n°	Histotipo	Tipo de amostra	Sexo	Idade ^a	Grau do tumor ^b	Tamanho do tumor (cm)	Metastização para gânglios linfáticos	Metastização à distância	Tempo de Follow-up (meses) ^c	Observações
1	PDTC	Tecido fresco	F	44	T4	8,0	n.d.	Presente	8	70% de ATC
2	PDTC	Tecido fresco	F	75	T4	4,0	Ausente	n.d.	12	10% de ATC
3	PDTC	Tecido fresco	M	67	T4	9,0	Ausente	Presente	123	Padrão insular
4	PDTC	Tecido fresco	M	58	T4	15,0	Presente	Presente	35	Tumor multifocal
5	PDTC	Tecido fresco	F	38	T4	13,0	Ausente	Presente	2	
6	PDTC	Tecido fresco	M	49	T2	4,0	n.d.	Presente	108	
7	PDTC	Tecido fresco	F	49	n.d.	n.d.	Presente	Presente	66	
8	PDTC	Tecido fresco	F	73	T1	2,0	n.d.	Presente	82	
9	PDTC	Tecido fresco	F	72	T3	4,5	Presente	Presente	12	Tumor multifocal
10	PDTC	Tecido fresco	M	36	T1	1,4	Presente	Presente	> 93	
11	PDTC	Tecido fresco	F	50	T2	3,3	Presente	Ausente	100	
12	PDTC	Tecido fresco	F	10	T2	2,5	Ausente	Ausente	43	
13	PDTC	FNAB	F	75	T3	6,0	Presente	Presente	66	
14	PDTC	FNAB	F	79	T4	7,0	Presente	Presente	8	
15	PDTC	FNAB	M	62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	Com áreas ATC
16	PDTC	Parafina	F	56	T4	9,0	Presente	Presente	> 84	
17	PDTC	Parafina	M	74	T4	2,5	n.d.	n.d.	> 84	
18	PDTC	Parafina	M	42	T4	6,0	Presente	n.d.	< 1	Padrão sarcomatóide
19	PDTC	Parafina	F	35	T4	4,0	Presente	Ausente	> 207	10% de PTC
20	PDTC	Parafina	F	69	T4	10,0	Presente	Presente	80	
21	PDTC	Parafina	F	45	T2	2,8	Ausente	Presente	> 144	
22	PDTC	Parafina	F	67	T3	2,5	Ausente	n.d.	48	
23	PDTC	Parafina	F	68	T4	> 13,0	n.d.	n.d.	1	

F, feminino; M, masculino; n.d., informação não disponível; PDTC – Carcinoma pouco diferenciado da tireóide; ATC – Carcinoma anaplásico da tireóide; FNAB – Citologia aspirativa de agulha fina. ^aIdade à data do diagnóstico; ^bClassificação de acordo com a WHO; ^cTempo de follow-up desde o diagnóstico até ao falecimento, ou até ao último contacto, ou, caso o doente permaneça vivo, até Julho de 2012.

Tabela III.1 – Aspectos clínico-patológicos dos doentes com PDTC e ATC (continuação).

Amostra n.º	Histotipo	Tipo de amostra	Sexo	Idade*	Grau do tumor ^o	Tamanho do tumor (cm)	Metastização para gânglios linfáticos	Metastização à distância	Tempo de Follow-up (meses) ^o	Observações
24	ATC	Tecido fresco	F	66	T4	9,0	Ausente	Presente	6	
25	ATC	Tecido fresco	F	77	T4	11,0	n.d.	n.d.	3	
26	ATC	Tecido fresco	F	62	T4	n.d.	Presente	Presente	< 1	
27	ATC	Tecido fresco	F	66	T4	8,0	Presente	Presente	8	
28	ATC	Tecido fresco	F	70	T4	n.d.	Presente	Presente	3	
29	ATC	Tecido fresco	M	76	T4	5,0	n.d.	Presente	7	
30	ATC	Tecido fresco	M	75	T4	n.d.	n.d.	Presente	2	
31	ATC	Tecido fresco	M	67	T4	n.d.	Presente	Presente	8	Diferenciação pavimentosa
32	ATC	Tecido fresco	F	68	T4	n.d.	n.d.	Presente	< 1	Células gigantes
33	ATC	Tecido fresco	F	68	T4	n.d.	Presente	Presente	6	
34	ATC	Tecido fresco	F	70	T4	n.d.	Presente	Presente	1	
35	ATC	Tecido fresco	M	58	T4	2,9	Presente	Presente	8	
36	ATC	Tecido fresco	M	68	T4	8,0	n.d.	n.d.	3	Areas de PTC
37	ATC	Tecido fresco	F	91	n.d.	n.d.	n.d.	Presente	1	
38	ATC	Tecido fresco	F	76	n.d.	n.d.	n.d.	Presente	3	
39	ATC	FNAB	F	58	T4	n.d.	n.d.	Presente	5	
40	ATC	FNAB	F	58	T4	n.d.	Presente	Presente	1	
41	ATC	FNAB	F	58	T4	n.d.	n.d.	Ausente	16	
42	ATC	FNAB	F	75	T4	n.d.	n.d.	Presente	2	
43	ATC	FNAB	F	78	T4	n.d.	Presente	Presente	< 1	
44	ATC	FNAB	F	80	T4	n.d.	n.d.	Ausente	1	
45	ATC	Parafina	F	80	T4	n.d.	Presente	Ausente	n.d.	
46	ATC	Parafina	F	56	T4	n.d.	Presente	Presente	3	
47	ATC	Parafina	F	75	T4	5,0	Ausente	Ausente	< 1	
48	ATC	Parafina	F	68	T4	9,0	Ausente	Presente	7	
49	ATC	Parafina	F	75	T4	n.d.	n.d.	Presente	91	

F, feminino; M, masculino; n.d., informação não disponível; PDTC – Carcinoma pouco diferenciado da tireóide; ATC – Carcinoma anaplásico da tireóide; FNAB – Citologia aspirativa de agulha fina. *Idade à data do diagnóstico; ^oClassificação de acordo com a WHO; ^oTempo de follow-up desde o diagnóstico até ao falecimento, ou até ao último contacto, ou, caso o doente permaneça vivo, até Julho de 2012.

A correlação entre os aspectos clínicos e histopatológicos e o diagnóstico PDTC vs ATC encontra-se descrita na Tabela III.2.

Tabela III.2 – Correlação entre os aspectos clínicos e histopatológicos e o diagnóstico PDTC vs ATC.

Características	PDTC	ATC	P-value
Sexo			0,5082 ^a
Feminino	70% (16/23)	81% (21/26)	
Masculino	30% (7/23)	19% (5/26)	
Idade no diagnóstico (anos), média ± DP	56,22 ± 3,61 (n = 23)	69,96 ± 1,67 (n = 26)	0,0016^c
Tamanho do tumor (cm), média ± DP	6,17 ± 0,88 (n = 21)	7,24 ± 0,95 (n = 8)	0,4942 ^b
Metastização para gânglios linfáticos			0,4564 ^a
Presente	65% (11/17)	78% (11/14)	
Ausente	35% (6/17)	21% (3/14)	
Metastização à distância			1,0000 ^a
Presente	82% (14/17)	83% (20/24)	
Ausente	18% (3/17)	17% (4/24)	

DP – Desvio padrão; ^aP-values calculados com o teste exacto de Fisher; ^bP-value calculado com o teste *t-Student*; ^cP-value calculado com o teste *t-Student* e correcção de Welch. Os valores a negrito representam variáveis estatisticamente significativas.

Na Figura III.1 está representada a curva de sobrevivência global dos doentes com PDTC e ATC, construída pelo método de *Kaplan-Meier*.

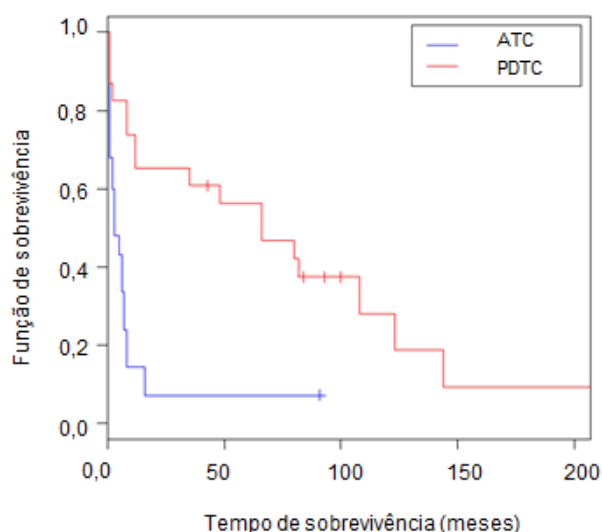


Figura III.1 - Curvas de sobrevivência dos doentes de ATC (n = 25) e PDTC (n = 23). $P = 0,0001$ calculado pelo teste *Log-rank*.

O teste *Log-rank* de comparação das curvas de sobrevivência global para as séries de doentes, com PDTC e ATC, indicou que havia evidência a favor da diferença entre as curvas ($P = 0,0001$).

2. Selecção de genes candidatos para o desenvolvimento de PDTC e ATC

No presente projecto de Mestrado foi realizada uma pesquisa de mutações em genes relacionados com as assinaturas moleculares identificadas. Foram seleccionados: a) genes envolvidos na regulação do ciclo celular e proliferação, como o supressor de tumor *TP53* (p53) e os CKI *CDKN2A* (p14^{ARF}, p16^{INK4A}), *CDKN1A* (p21^{WAF1/CIP1}), *CDKN2B* (p15^{INK4B}), *CDKN1B* (p27^{KIP1}) e *CDKN2C* (p18^{INK4C}); b) genes envolvidos na adesão celular, EMT e invasão: *CTNNB1* (β-catenina) e *AXIN1* (Axina-1); c) os proto-oncogenes *H-*, *K-* e *N-RAS*, *BRAF* e *PIK3CA*, cujo envolvimento no desenvolvimento de WDTC e/ou PDTC e ATC foi previamente descrito.

Foi também realizado um estudo dos níveis de expressão do gene *SNAI2* (Slug), cujo aumento de expressão se encontra relacionado com perda de adesão celular, aumento da capacidade de invasão e EMT.

3. Identificação de alterações genéticas

As amostras de PDTC e ATC foram analisadas para a presença de alterações nos genes seleccionados (secção III.2).

A pesquisa de alterações nos PDTC e ATC foi estendida às amostras de tecidos conservados em parafina, apenas para os genes em que tinham sido previamente identificadas mutações nas amostras de tecido fresco.

Para todas as alterações genéticas identificadas foi efectuada uma pesquisa em bases de dados de SNP (e.g. dbSNP). Quando a alteração não representava uma variante comum na população, procedeu-se à pesquisa em bases de dados de mutações previamente descritas em cancro (e.g. COSMIC e HGMD). Quando a variante era nova, utilizaram-se as ferramentas informáticas *Polyphen*, *SIFT* e *MutationTaster* para prever *in silico* o seu efeito funcional na proteína alterada. Procedeu-se ainda, quando possível, à pesquisa da mutação a nível germinal (tecido normal, e.g. tiróide contralateral, gânglios; ou sangue) do doente afectado, para determinar se a variante ocorria a nível germinal ou somático.

As mutações e polimorfismos identificados neste trabalho estão descritos nas secções 3.1 e 3.2 do presente capítulo, respectivamente.

3.1. Mutações

A amplificação por PCR e sequenciação dos produtos obtidos permitiu a identificação de mutações nos diferentes genes, na série de PDTC e ATC. Durante este processo surgiram algumas dificuldades na amplificação e/ou sequenciação de exões de alguns genes, em várias amostras, especialmente de tecidos conservados em parafina, e provenientes de FNAB, possivelmente devido à degradação dos ácidos nucleicos (DNA, RNA). Para ultrapassar esta limitação, desenharam-se novos *primers* para exões de alguns genes, dividindo-os em vários segmentos, para originar *amplicons* mais pequenos.

As alterações genéticas identificadas na presente série de PDTC e ATC, que não foram descritas como polimorfismos encontram-se descritas nesta secção. As mutações previamente descritas encontram-se referenciadas, bem como o seu efeito funcional, previsto *in silico*, e/ou *in vitro*.

3.1.1. BRAF

Para o gene *BRAF* foi estudado apenas o exão 15, onde se localiza o *hot-spot* no qual ocorrem mais de 95% das mutações neste gene. Foram estudados 49 tumores primários (26 ATC e 23 PDTC), e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). As mutações identificadas encontram-se descritas na Tabela III.3.

Tabela III.3 – Mutações identificadas no gene *BRAF* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
20	PDTC	c.1825C>T	p.Gln609X	Sim	n.e.	^a Patogénica	Tie <i>et al.</i> , 2011
		c.1792G>A	p.Ala598Thr	Sim	n.e.	^a Patogénica	Deichmann <i>et al.</i> , 2006
37	ATC	c.1799T>A	p.Val600Glu	Sim	n.e.	^b Patogénica	Nucera, <i>et al.</i> , 2010
T235	ATC	c.1799T>A	p.Val600Glu	Sim	n.e.	^b Patogénica	Nucera, <i>et al.</i> , 2010
T238	ATC	c.1799T>A	p.Val600Glu	Sim	^c Ausente	^b Patogénica	Nucera, <i>et al.</i> , 2010

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*; ^cT238 – mutação presente no tumor que deu origem à linha celular. Ref^a - Referência

3.1.2. *N-, H- e K-RAS*

Para os genes *RAS*, foram estudados exões nos quais estão descritos *hot-spots* para mutações: *N-RAS* – exões 2 e 3; *H-RAS* – exões 1 e 2; *K-RAS* – exões 2 e 3. Foram estudados 49 tumores primários (26 ATC e 23 PDTC) e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). Apenas foram identificadas mutações nos genes *N-RAS* e *H-RAS*, que se encontram descritas nas Tabelas III.4 e III.5, respectivamente.

Tabela III.4 – Mutações identificadas no gene *N-RAS* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
3	PDTC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
6	PDTC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
7	PDTC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
8	PDTC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
26	ATC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
40	ATC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
30	ATC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
32	ATC	c.181C>A	p.Gln61Lys	Sim	n.e.	^b Patogénica	Manenti <i>et al.</i> , 1994
33	ATC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
43	ATC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
34	ATC	c.181C>A	p.Gln61Lys	Sim	n.e.	^b Patogénica	Manenti <i>et al.</i> , 1994

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*. Ref^a - Referência

Tabela III.5 – Mutações identificadas no gene *H-RAS* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
38	ATC	c.182A>G	p.Gln61Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Manenti <i>et al.</i> , 1994
C643	ATC	c.37G>C	p.Gly13Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Cavaco <i>et al.</i> , 2008

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*. Ref^a - Referência

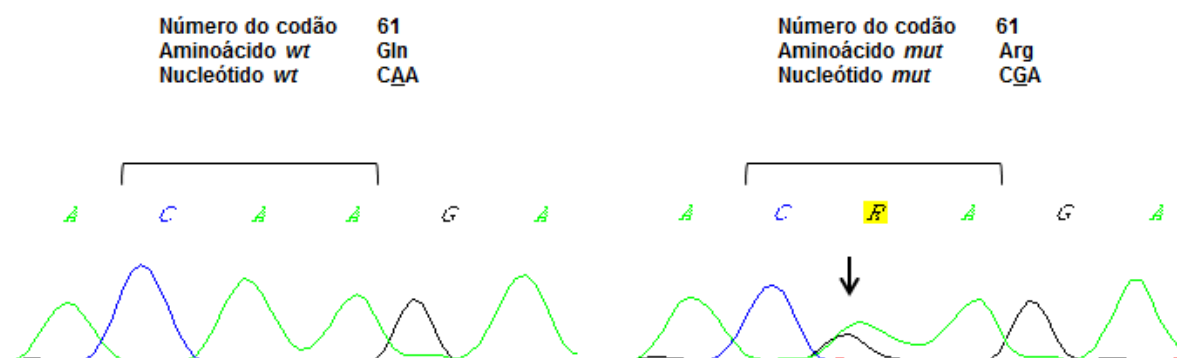


Figura III.2 Sequenciação do exão 3 do gene *N-RAS* numa amostra com sequência wt (imagem à esquerda) e numa amostra com a mutação c.182A>G (imagem à direita), que deverá conduzir à substituição de um resíduo de Gln por um resíduo de Arg.

3.1.3. TP53

Para o gene *TP53* foram estudados os exões 5 a 9, nos quais se encontram descritas com maior frequência mutações. Foram estudados 49 tumores primários (26 ATC e 23 PDTC), e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). Identificaram-se mutações nos vários exões do gene, que se encontram descritas na Tabela III.6.

Tabela III.6 - Mutações identificadas no gene *TP53* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
1	PDTC	c.873_888del	p.Lys291Asn fs*49	Sim	n.e.	^d Patogénica	-
5	PDTC	c.743G>A	p.Arg248Gln	Sim	n.e.	^b Patogénica	Ito <i>et al.</i> , 1992
17	PDTC	c.742C>T	p.Arg248Trp	Não	n.e.	^b Patogénica	Wang <i>et al.</i> , 2007
		c.868C>T	p.Arg290Cys	Sim	n.e.	^a Patogénica	Poremba <i>et al.</i> , 1995
21	PDTC	c.524G>A	p.Arg175His	Não	n.e.	^b Patogénica	Boyault <i>et al.</i> , 2012
		c.620A>G	p.Asp207Gly	Não	n.e.	^a Patogénica	Crook <i>et al.</i> , 1998
23	PDTC	c.422G>A	p.Cys141Tyr	Sim	n.e.	^b Patogénica	Eriksen <i>et al.</i> , 2005
		c.515T>A	p.Val172Asp	Não	n.e.	^a Patogénica	Powell <i>et al.</i> , 2000
46	ATC	c.737T>C	p.Met246Thr	Sim	n.e.	^a Patogénica	Powell <i>et al.</i> , 2000
24	ATC	c.380C>T	p.Ser127Phe	Sim	n.e.	^a Patogénica	Kashkin <i>et al.</i> , 2007
25	ATC	c.817C>T	p.Arg273Cys	Sim	n.e.	^b Patogénica	Ito <i>et al.</i> , 1992
47	ATC	c.548C>G	p.Ser183X	Sim	n.e.	^a Patogénica	Soong <i>et al.</i> , 2000
48	ATC	c.641A>G	p.His214Arg	Sim	n.e.	^b Patogénica	Audrézet <i>et al.</i> , 1993
27	ATC	c.817C>T	p.Arg273Cys	Sim	n.e.	^b Patogénica	Ito <i>et al.</i> , 1992
41	ATC	c.451C>T	p.Pro151Ser	Não	n.e.	^b Patogénica	Alsner <i>et al.</i> , 2001
28	ATC	c.524G>A	p.Arg175His	Sim	n.e.	^b Patogénica	Boyault <i>et al.</i> , 2012

Resultados

Tabela III.6 - Mutações identificadas no gene *TP53* em PDTC e ATC (continuação).

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
30	ATC	c.404G>A	p.Cys135Tyr	Sim	n.e.	^b Patogénica	Goh <i>et al.</i> , 1995
31	ATC	c.583A>T	p.Ile195Phe	Sim	n.e.	^a Patogénica	van Oijen <i>et al.</i> , 1998
		c.733G>C	p.Gly245Arg	Sim	n.e.	^a Patogénica	Soong <i>et al.</i> , 2000
44	ATC	c.743G>A	p.Arg248Gln	Sim	n.e.	^b Patogénica	Ito <i>et al.</i> , 1992
C643	ATC	c.743G>A	p.Arg248Gln	Não	n.e.	^b Patogénica	Ito <i>et al.</i> , 1992
T238	ATC	c.548C>G	p.Ser183X	Não	^c Ausente	^a Patogénica	Soong <i>et al.</i> , 2000

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*; ^cT238 – mutação presente no tumor que deu origem à linha celular. ^dMutação considerada patogénica porque é esperado que resulte na codificação de uma proteína truncada. Ref^a - Referência

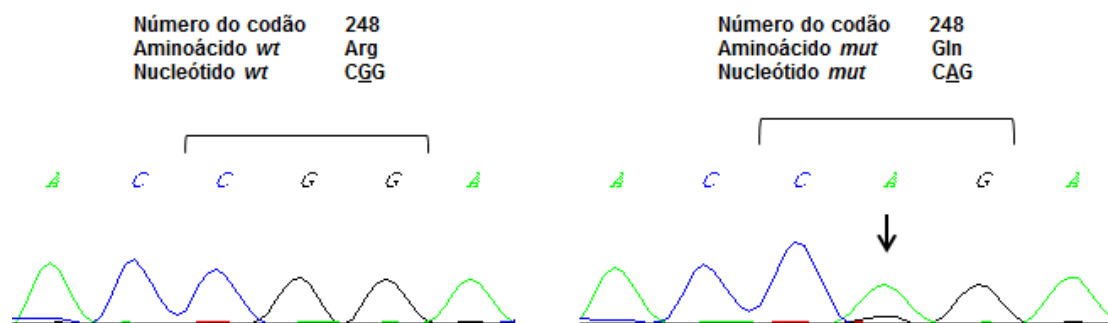


Figura III.3 – Sequenciamento do exão 7 do gene *TP53* numa amostra com sequência wt (imagem à esquerda) e numa amostra com a mutação c.743G>A (imagem à direita), que deverá conduzir à substituição de um resíduo de Arg por um resíduo de Gln.

3.1.4. *PIK3CA*

Para o gene *PIK3CA* foram estudados os exões 1, 9 e 20, nos quais se encontram descritas mutações. Foram estudados 49 tumores primários (26 ATC e 23 PDTC) e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). Foram identificadas mutações que se encontram descritas na Tabela III.7.

Tabela III.7 – Mutações identificadas no gene *PIK3CA* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
17	PDTC	c.3032C>T	p.Pro1011Leu	Sim	Ausente	^a Patogénica	-
19	PDTC	c.169C>T	p.Pro57Ser	Sim	Ausente	^a Patogénica	-
		c.3171G>A	p.Trp1057X	Sim	Ausente	^a Patogénica	Shi <i>et al.</i> , 2012
20	PDTC	c.253G>A	p.Glu85Lys	Sim	Ausente	^a Patogénica	-
		c.3100G>T	p.Glu1034X	Sim	Ausente	^a Patogénica	-

Tabela III.7 – Mutações identificadas no gene *PIK3CA* em PDTC e ATC (continuação).

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
37	ATC	c.1624G>A	p.Glu542Lys	Sim	Ausente	^b Patogénica	García-Rostan <i>et al.</i> , 2005
T238	ATC	c.1624G>A	p.Glu542Lys	Sim	^c Ausente	^b Patogénica	García-Rostan <i>et al.</i> , 2005

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*; ^cT238 – mutação presente no tumor que deu origem à linha celular. Ref^a - Referência

3.1.5. *CTNNB1*

Para o gene *CTNNB1* foi estudado apenas o exão 3, no qual se encontram descritos *hot-spots* para mutações. Foram estudados 49 tumores primários (26 ATC e 23 PDTC) e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). Foi encontrada apenas uma mutação que se encontra descrita na Tabela III.8.

Tabela III.8 – Mutações identificadas no gene *CTNNB1* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
20	PDTC	c.163G>A	p.Glu55Lys	Sim	n.e.	^a Patogénica	García-Rostan <i>et al.</i> , 1999

n.e. não estudado; ^a*In silico* (*MutationTaster*). ^b*In silico* e *in vitro*. Ref^a - Referência

3.1.6. *AXIN1*

Para o gene *AXIN1* foram estudados todos os exões codificantes (exões 2-11) em 26 tumores primários (14 ATC e 12 PDTC). Foram identificadas variantes genéticas que se encontram descritas na Tabela III.9.

Tabela III.9 – Variantes identificadas no gene *AXIN1* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
12	PDTC	c.1046G>A	p.Arg349His	Sim	Presente	^a Benigna	-
33	ATC	c.769G>A	p.Asp257Asn	Sim	Presente	^a Benigna	-

^a*In silico*; ^b*In silico* e *in vitro*. Ref^a - Referência

3.1.7. *CDKN2A*

Para o gene *CDKN2A* foram estudados todos os exões codificantes das proteínas p14^{ARF} e p16^{INK4A}. Analisaram-se 42 tumores primários (22 ATC e 20 PDTC) e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). Foram identificadas mutações/variantes que se encontram descritas na Tabela III.10.

Tabela III.10 – Mutações/variantes identificadas no gene *CDKN2A* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Alteração de nucleótido	Alteração de resíduo de aminoácido	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
17	PDTC	c.445G>A	p.Glu149Lys (p16 ^{INK4A})	Sim	Ausente	^a Benigna	-
19	PDTC	c.436G>A	p.Asp146Asn (p16 ^{INK4A})	Sim	Ausente	^a Benigna	-
20	PDTC	c.159G>A	p.Met53Ile (p16 ^{INK4A})	Sim	Ausente	^a Patogénica	-
		c.202G>A	p.Asp68Asn (p14 ^{ARF})	Sim	Ausente	^a Patogénica	-
26	ATC	c.3G>A	p.Met1Ile (p14 ^{ARF})	Sim	n.e.	^a Patogénica	-
C643	ATC	c.1_471del	Delecção do gene	^e Não	n.e.	^c Patogénica	Jones <i>et al.</i> , 1996
T238	ATC	c.188T>G	p.Leu63Arg (p16 ^{INK4A})	Não	^d Ausente	^a Patogénica	-

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*; ^c*In vitro*; ^dT238 – mutação presente no tumor que deu origem à linha celular; ^eDelecção do gene em homozigotia. Ref^a - Referência

3.1.8. *CDKN2B*

Para o gene *CDKN2B* foram estudados os 2 exões codificantes da proteína p15^{INK4B}. Analisaram-se 42 tumores primários (22 ATC e 20 PDTC) e 6 linhas celulares (4 de ATC e 2 de PDTC). Foram identificadas mutações/variantes que se encontram descritas na Tabela III.11.

Tabela III.11 – Mutações/variantes identificadas no gene *CDKN2B* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Mutação	Efeito esperado na proteína	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
16	PDTC	c.62C>T	p.Ala21Val	Sim	n.e.	^a Patogénica	-
17	PDTC	c.24G>A	p.Met8Ile	Não	n.e.	^a Benigna	-
23	PDTC	c.109G>A	p.Gly37Ser	Sim	n.e.	^a Patogénica	-
C643	ATC	c.1_138del	Delecção do gene	^c Não	n.e.	^d Patogénica	Elisei <i>et al.</i> , 1998

n.e. não estudado; ^a*In silico*, ^b*In silico* e *in vitro*; ^cDelecção do gene em homozigotia. ^dMutação considerada patogénica porque é esperado que resulte na codificação de uma proteína truncada. Ref^a - Referência

3.1.9. *CDKN2C*

Para o gene *CDKN2C* foram estudados os seus 2 exões codificantes (3 e 4) da proteína p18^{INK4C}. Analisaram-se 29 tumores primários (12 PDTC e 17 ATC) e 6 linhas celulares (2 de PDTC e 4 de ATC). Identificou-se apenas uma alteração descrita na Tabela III.12.

Tabela III.12 – Mutações identificadas no gene *CDKN2C* em PDTC e ATC.

Amostra nº	Histotipo	Mutação	Efeito esperado na proteína	Heterozigotia	Tecido normal	Efeito previsto na função da proteína	Ref ^a
44	ATC	c.295_297del	p.Glu99del	Sim	n.e.	^a Patogénico	-

n.e. não estudado; ^aIn silico, ^bIn silico e in vitro. Ref^a - Referência

3.1.10. *CDKN1A*

Para o gene *CDKN1A* foram estudados os seus 2 exões codificantes (2 e 3) da proteína p21^{CIP1/WAF1}. Analisaram-se 29 tumores primários (12 PDTC e 17 ATC) e 6 linhas celulares (2 de PDTC e 4 de ATC). Não foram identificadas quaisquer mutações neste gene.

3.1.11. *CDKN1B*

Para o gene *CDKN1B* foram estudados os seus 2 exões codificantes (1 e 2) da proteína p27^{KIP1}. Analisaram-se 29 tumores primários (12 PDTC e 17 ATC) e 6 linhas celulares (2 de PDTC e 4 de ATC). Não foram identificadas quaisquer mutações neste gene.

3.2. Polimorfismos

Os polimorfismos identificados na análise da sequência dos diferentes genes, na série de PDTC e ATC, encontram-se descritos na Tabela III.13.

Tabela III.13 – Polimorfismos identificados nas amostras de tumores primários e linhas celulares de PDTC e ATC.

Gene	Identificação do polimorfismo	Polimorfismo	Frequência alélica em PDTC e ATC	Frequência alélica na população Europeia ^a
H-RAS	rs12628	c.81T>C p.His27His	C = 67,9 % (36/53)	C = 29,6%
	rs41294870	c.-10C>T	T = 2,2% (1/46)	T = 4,5%
TP53	rs1800372	c.639A>G p.Arg213Arg	G = 3,8% (2/53)	G = 1,7%
	rs34949160	c.672+31A>G	G = 1,9% (1/53)	^b G = 0,0%
PIK3CA	rs115746478	c.353C>T p.Ile121Ile	T = 1,8% (1/55)	T = 0,8%
AXIN1	rs758033	c.-19C>A	A = 44% (11/25)	A = 23,0%
	rs1805105	c.762C>T p.Asp254Asp	T = 26,9% (7/26)	T = 39,4%
	rs62032881	c.1254+17G>A	A = 30,8% (8/26)	A = 12,5%
	rs214250	c.1284G>A p.Ser428Ser	A = 26,9% (7/26)	A = 22,6%
	rs214252	c.1827T>C p.Ala609Ala	C = 28,0% (7/25)	C = 22,3%
	rs117820439	c.1785-31C>A	A = 4% (1/25)	A = 6,7%
	rs118063900	c.2294+8C>T	T = 7,7% (2/26)	T = 1,7%
CDKN2A	rs3814960	c.-191A>G	G = 77,1% (37/48)	G = 35,8%
CDKN2B	rs2069426	c.157-27C>A	A = 10,9% (5/46)	A = 5,8%
CDKN1A	rs762624	c.-37-91A>C	C = 34,3% (12/35)	C = 27,5%
	rs2395655	c.-20A>G	G = 60,6% (21/35)	G = 39,4%
	rs1801270	c.93C>A p.Ser31Arg	A = 5,7% (2/35)	A = 6,6%
	rs4986867	c.189C>A p.Phe63Leu	A = 2,9% (1/35)	^b A = 0,0%
	rs3176352	c.445+16C>G	G = 11,4% (4/35)	G = 23,1%
	rs1059234	c.*20C>T	T = 5,9% (2/34)	T = 3,5%
CDKN1B	rs34330	c.-79C>T	T = 22,9% (8/35)	C = 25,7%
	rs2066827	c.326T>G p.Val109Gly	G = 54,3% (19/35)	G = 22,1%
CDKN2C	rs1043141	c.342C>T p.Gly114Gly	T = 11,4% (4/35)	T = 8,3%

^aFrequências obtidas na base de dados HapMap ou 1000Genomes, NCBI; ^bVariante rara.

4. Estudo quantitativo dos níveis de expressão do gene *SNAI2*

Por qPCR quantificaram-se os níveis de expressão do gene *SNAI2* em várias amostras de diferentes histotipos de tumores, de linhas celulares e de tecido normal da tiróide. Na Figura III.4. estão representados os níveis de expressão obtidos.

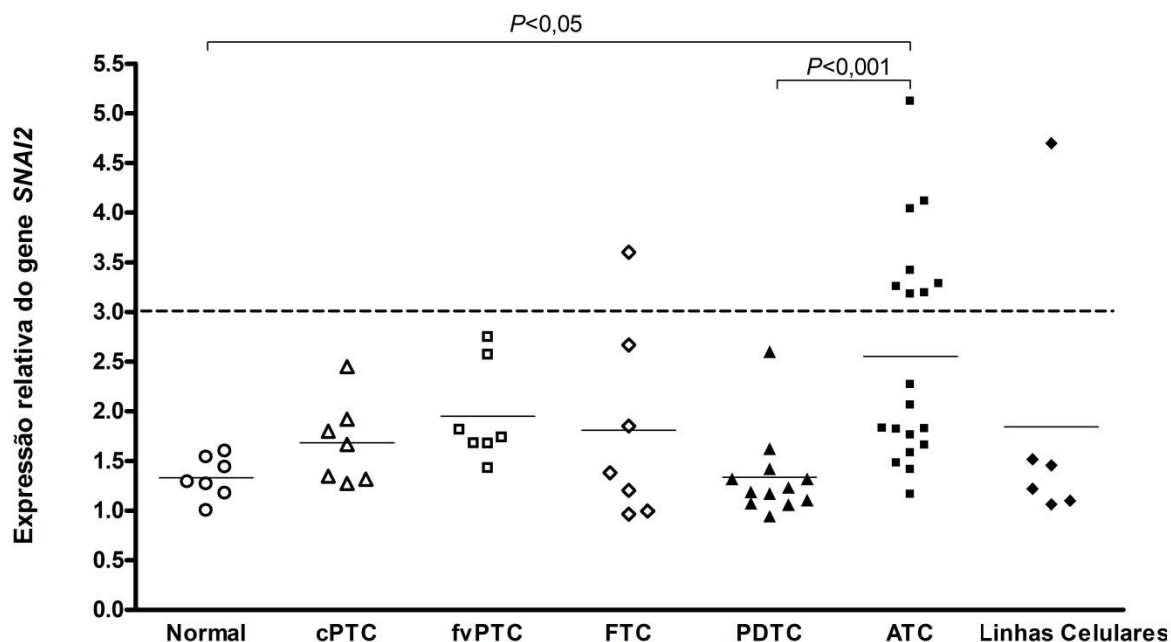


Figura III.4 - Expressão relativa do gene *SNAI2* nos diferentes histotipos. Os níveis de expressão estão representados em relação aos níveis de expressão do calibrador. A sobre-expressão de *SNAI2* foi considerada para valores de expressão relativa ≥ 3 . Foram estudadas 4 linhas celulares de ATC (C643, T235, T238 e T241) e 2 linhas celulares de PDTC (T243 e T351).

Observou-se sobre-expressão do gene *SNAI2* num subgrupo dos ATC, numa amostra de FTC, e numa linha celular de ATC (C643).

Os dados foram analisados com o teste estatístico *one-way* ANOVA, o qual indicou que havia evidência a favor da diferença nos níveis de expressão do gene *SNAI2* entre as séries de PDTC e ATC ($P < 0,001$), e entre as séries de ATC e tiróide normal ($P < 0,05$). Para os restantes histotipos, não se observaram diferenças significativas.

5. Alterações identificadas na sequência e expressão dos genes analisados na série de PDTC e ATC

Na Tabela III.14 estão representados os resultados globais da pesquisa de mutações nos diferentes genes e quantificação da expressão do gene *SNAI2* na série de PDTC e ATC.

Tabela III.14 – Alterações identificadas na sequência e expressão dos diferentes genes analisados na série de PDTC e ATC.

Histotipo	Tipo de Amostra	Amostra nº	RAS				TP53	PIK3CA	CTNNB1	AXIN1	CDKN2A	CDKN2B	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2C	Sobre-expressão <i>SNAI2</i>
			BRAF	M-RAS	H-RAS	K-RAS										
Tecido fresco		1	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		3	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		4	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		5	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		6	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		7	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		8	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		10	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
PDTC	FNA/B	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	Parafina	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
		17	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS (p16 ^{INK4a})	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Linha celular	T243	19	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS (p16 ^{INK4a})	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		20	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS (p16 ^{INK4a})	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		21	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	T351	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		23	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
		T243	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

POS – Amostra com mutação no gene (*mut*); NEG – Amostra sem mutação no gene (*wt*); As células a cinzento representam os genes e amostras que não foram estudados.

Tabela III.14 – Alterações identificadas na sequência e expressão dos diferentes genes analisados na série de PDTC e ATC (continuação).

Histótipo	Tipo de Amostra	Amostra n°	BRAF	RAS			TP53	PIK3CA	CTNNB1	AXIN1	CDKN2A	CDKN2B	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2C	Sobre-expressão SNAI2
				N-RAS	H-RAS	K-RAS										
ATC	Tecido fresco	24	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		25	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		26	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS (p14 ^{del})	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		27	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		28	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		29	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		30	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		31	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		32	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		33	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		34	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
ATC	FNAB	35	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		36	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		37	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		38	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
		40	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		41	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		42	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		43	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		44	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
		45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Parafina	Parafina	46	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		47	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		48	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		49	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		C643	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS (p16 ^{ink4a})	POS	NEG	NEG	NEG	POS
		T235	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		T238	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS (p16 ^{ink4a})	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
		T241	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

POS – Amostra com mutação no gene (mut); NEG – Amostra sem mutação no gene (wt); As células a cinzento representam os genes e amostras que não foram estudados.

Na Tabela III.15 estão representadas as frequências das mutações nos diferentes genes e da sobre-expressão do gene *SNAI2* na série de PDTC e ATC.

Tabela III.15 – Frequência das mutações nos diferentes genes e sobre-expressão do gene *SNAI2* identificadas na série de PDTC e ATC.

Histotipo	Tipo de Amostra	BRAF	RAS			TP53	PIK3CA	CTNNB1	AXIN1	CDKN2A	CDKN2B	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2C	Sobre-expressão de <i>SNAI2</i>
			N-RAS	H-RAS	K-RAS										
PDTC	Tumores primários	4% (1/23)	17% (4/23)	0% (0/23)	0% (0/22)	22% (5/23)	13% (3/23)	5% (1/20)	0% (0/12)	15% (3/20)	10% (2/20)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
	Linhas celulares	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)		0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
	Total	4% (1/25)	16% (4/25)	0% (0/25)	0% (0/24)	20% (5/25)	12% (3/25)	5% (1/22)	0% (0/12)	14% (3/22)	9% (2/22)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)	0% (0/14)
ATC	Tumores primários	4% (1/24)	28% (7/25)	4% (1/26)	0% (0/25)	42% (11/26)	4% (1/26)	0% (0/26)	0% (0/14)	5% (1/22)	0% (0/22)	0% (0/17)	0% (0/17)	6% (1/17)	42% (8/19)
	Linhas celulares	50% (2/4)	0% (0/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	50% (2/4)	25% (1/4)	0% (0/4)		50% (2/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	0% (0/4)	0% (0/4)	25% (1/4)
	Total	11% (3/28)	24% (7/29)	7% (2/30)	0% (0/29)	43% (13/30)	7% (2/30)	0% (0/30)	0% (0/14)	12% (3/26)	4% (1/26)	0% (0/21)	0% (0/21)	5% (1/21)	39% (9/23)
PDTC + ATC	Tumores primários	4% (2/47)	23% (11/48)	2% (1/49)	0% (0/47)	33% (16/49)	8% (4/49)	2% (1/46)	0% (0/26)	10% (4/42)	5% (2/42)	0% (0/29)	0% (0/29)	3% (1/29)	26% (8/31)
	Linhas celulares	33% (2/6)	0% (0/6)	17% (1/6)	0% (0/6)	33% (2/6)	17% (1/6)	0% (0/6)		33% (2/6)	17% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	17% (1/6)
	Total	8% (4/53)	20% (11/54)	4% (2/55)	0% (0/53)	33% (18/55)	9% (5/55)	2% (1/52)	0% (0/26)	13% (6/48)	6% (3/48)	0% (0/35)	0% (0/35)	3% (1/35)	24% (9/37)

As células a cinzento representam os genes e amostras que não foram estudados.

6. Correlação entre as alterações genéticas identificadas em PDTC e ATC e o diagnóstico histológico

A correlação entre a frequência de mutações nos diferentes genes e sobre-expressão do gene *SNAI2* vs o diagnóstico PDTC ou ATC, encontra-se descrita na Tabela III.16.

Tabela III.16 - Correlação entre as mutações e sobre-expressão identificadas e o diagnóstico histológico

Gene com mutação/sobre-expressão	Frequência em PDTC	Frequência em ATC	<i>P-value</i>
<i>BRAF</i>	4% (1/23)	4% (1/24)	1,0000 ^a
<i>RAS</i>	17 % (4/23)	31% (8/26)	0,3334 ^a
<i>TP53</i>	22% (5/23)	42% (11/26)	0,1431 ^a
<i>PIK3CA</i>	13% (3/23)	4% (1/26)	0,3112 ^a
<i>CTNNB1</i>	5% (1/20)	0% (0/26)	0,4348 ^a
<i>CDKN2A</i>	15% (3/20)	5% (1/22)	0,3327 ^a
<i>CDKN2B</i>	10% (2/20)	0% (0/22)	0,2207 ^a
<i>CDKN2C</i>	0% (0/12)	6% (1/17)	1,0000 ^a
<i>SNAI2</i>	0% (0/12)	42% (8/19)	0,0116^a

^a*P-values* calculados com o teste exacto de *Fisher*; Os valores a negrito representam variáveis estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Os cálculos estatísticos não incluíram os resultados das linhas celulares.

O teste da correlação entre a sobre-expressão de *SNAI2* vs o diagnóstico de PDTC ou ATC foi significativo ($P = 0,0116$) indicando que havia evidência de que os ATC possuem um nível de expressão mais elevado de *SNAI2* do que os PDTC. Este teste confirmou os resultados obtidos no teste *one-way* ANOVA, no qual se compararam os níveis de expressão do *SNAI2* obtidos para os diferentes tipos de tumor (secção III.4). O teste da correlação entre as mutações nos restantes genes e o diagnóstico de PDTC ou ATC não foi estatisticamente significativo.

7. Correlação entre as alterações genéticas identificadas em PDTC e ATC

Seleccionaram-se as alterações genéticas mais relevantes na série de PDTC e ATC em estudo.

Colocou-se a hipótese de mútua exclusividade das mutações nos genes *TP53* e *RAS*, no aparecimento de PDTC e ATC. Na Tabela III.17 estão indicados os resultados da análise estatística. Para os testes de correlação não foram considerados os resultados das linhas celulares.

Tabela III.17 – Correlação entre as mutações nos genes *RAS* e *TP53* em PDTC e ATC

Genes com mutação	Frequência em PDTC e ATC	P-value
<i>TP53 mut</i> e <i>RAS mut</i>	2% (1/49)	0,0733 ^a
<i>TP53 mut</i> e <i>RAS wt</i>	31% (15/49)	
<i>RAS mut</i> e <i>TP53 wt</i>	22% (11/49)	
<i>TP53 wt</i> e <i>RAS wt</i>	45% (22/49)	

^aP-value calculado com o teste exacto de Fisher. *mut* – gene mutado; *wt* – gene sem mutação.

Tendo em conta que as mutações nos genes *RAS* e *BRAF* são mutuamente exclusivas (Nikiforov, 2011), colocou-se a hipótese de mútua exclusividade das mutações nos genes *TP53* e *BRAF* ou *RAS*, no aparecimento de PDTC e ATC. Na Tabela III.18 estão indicados os resultados da análise estatística.

Tabela III.18 – Correlação entre as mutações nos genes *BRAF* ou *RAS* e *TP53* em PDTC e ATC

Genes	Frequência em PDTC e ATC	P-value
<i>TP53 mut</i> e <i>BRAF mut</i> ou <i>RAS mut</i>	2% (1/49)	0,0193^a
<i>TP53 mut</i> e <i>BRAF wt</i> e <i>RAS wt</i>	31% (15/49)	
<i>BRAF mut</i> ou <i>RAS mut</i> e <i>TP53 wt</i>	27% (13/49)	
<i>TP53 wt</i> e <i>BRAF wt</i> e <i>RAS wt</i>	41% (20/49)	

^aP-value calculado com o teste exacto de Fisher; Os resultados das linhas celulares não foram considerados. Os valores a negrito representam variáveis estatisticamente significativas. *mut* – gene mutado; *wt* – gene sem mutação.

Os resultados da análise estatística indicaram que havia evidência a favor da mútua exclusividade entre as mutações nos genes *TP53* e *RAS* ou *BRAF*, em PDTC e ATC ($P = 0,0193$).

8. Correlação entre alterações genéticas e aspectos clínico-patológicos dos doentes com PDTC e ATC

Após a análise das mutações, avaliou-se a sua correlação com diferentes aspectos clínico-patológicos dos doentes.

Para testar a correlação entre a presença de mutações no gene *TP53* ou nos genes *RAS* ou *BRAF* e o tempo de sobrevivência dos doentes com PDTC ou ATC, construíram-se curvas de sobrevivência global para os doentes com mutações nestes genes e para os doentes sem mutações nestes genes, pelo método de *Kaplan-Meier* (Figuras III.5 e III.6).

Nestes casos, consideraram-se *wt*, apenas as amostras que não apresentavam mutação nos genes *TP53*, *RAS* e *BRAF*. A amostra nº 30 com *TP53 mut* e *RAS mut* foi excluída destes testes, porque não seria possível determinar de qual dos genes proviria o efeito no aspecto clínico em estudo.

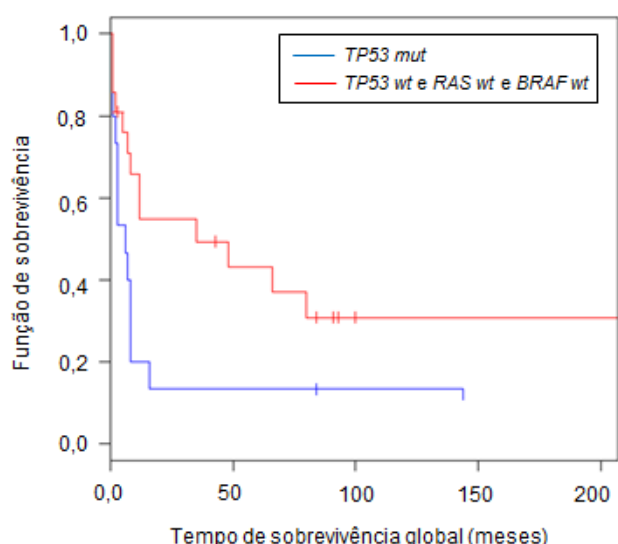


Figura III.5 – Curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC, com *TP53 mut* (n = 15) vs *TP53 wt* e *RAS wt* e *BRAF wt* (n = 19). $P = 0,0193$ calculado pelo teste de *Log-rank*. *mut* – gene mutado; *wt* – gene sem mutação.

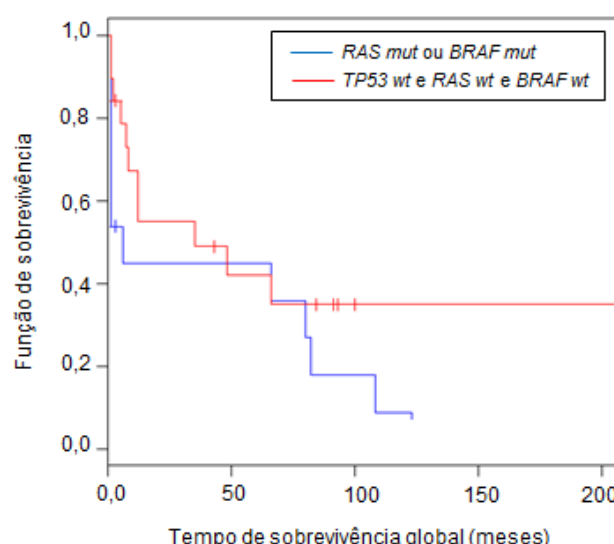


Figura III.6 – Curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC, com *RAS mut* ou *BRAF mut* (n = 13) vs *RAS wt* e *BRAF wt* e *TP53 wt* (n = 19). $P = 0,1648$ calculado pelo teste de *Log-rank*. *mut* – gene mutado; *wt* – gene sem mutação.

No teste de comparação das curvas de sobrevivência global para os doentes com *TP53 mut* vs *TP53 wt* e *RAS wt* e *BRAF wt* (Figura III.5), observou-se uma diferença significativa ($P = 0,0193$), sendo que os doentes com *TP53 mut* apresentaram um menor tempo de sobrevivência global. As curvas de sobrevivência global para os doentes com *RAS mut* ou *BRAF mut* vs *TP53 wt* e *RAS wt* e *BRAF wt* não apresentaram diferenças significativas (Teste de *Log-rank*; $P = 0,1648$).

Testou-se também a correlação entre a presença de mutações no gene *TP53* e/ou mutações nos genes *RAS* e *BRAF* e o tempo de sobrevivência global dos doentes com PDTC e ATC (Figura III.7). A amostra nº 30, com *TP53 mut* e *RAS mut*, foi incluída neste teste.

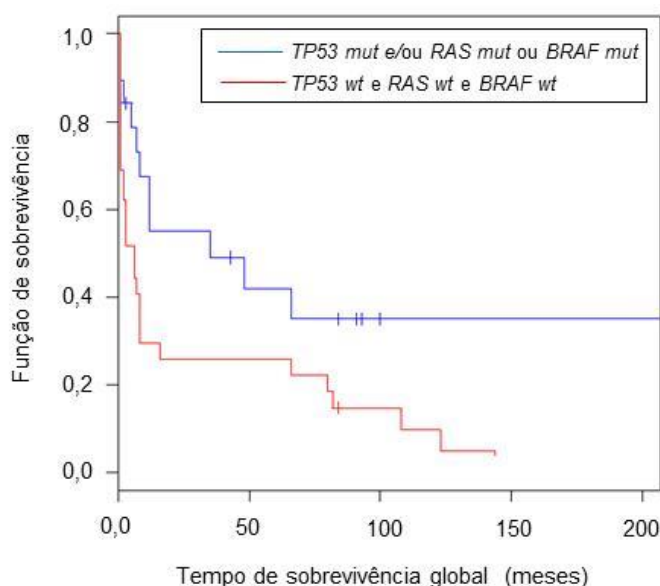


Figura III.7 – Curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC, com *TP53 mut* e/ou *RAS mut* ou *BRAF mut* (n = 29) vs *RAS wt* e *BRAF wt* e *TP53 wt* (n = 19). $P = 0,0222$ calculado pelo teste de Log-rank. mut – gene mutado; wt – gene sem mutação.

As curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC com *TP53 mut* e/ou *RAS mut* ou *BRAF mut* vs *TP53 wt* e *RAS wt* e *BRAF wt*, apresentaram diferenças significativas (Teste de Log-rank; $P = 0,0222$) (Figura III.7). Este resultado indicou que havia evidências a favor da associação entre a presença de mutações nos genes *TP53*, *RAS* ou *BRAF* e um menor tempo de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC.

Colocou-se também a hipótese de que a presença de mutações nos genes *TP53* e/ou *RAS* ou *BRAF* pudesse influenciar a idade do diagnóstico, o tamanho do tumor, a invasão dos gânglios linfáticos ou a metastização à distância. No entanto, possivelmente devido à falta de dados acerca destes parâmetros, principalmente em ATC, não se obtiveram resultados estatisticamente significativos (resultados não apresentados).

Colocou-se ainda a hipótese de que o número de genes mutados em cada tumor poderia influenciar a idade de aparecimento do tumor. Os resultados da análise estatística estão indicados na Tabela III.19.

Tabela III.19 – Correlação entre o número de mutações em cada tumor, e a idade dos doentes com PDTC e ATC à data do diagnóstico.

Histotipo	Idade no diagnóstico (anos), média \pm DP		P-value
	0 mutações	1 ou mais mutações	
PDTC	56,91 \pm 6,33 (n = 11)	55,58 \pm 4,06 (n = 12)	0,8593 ^a
ATC	70,00 \pm 3,37 (n = 7)	69,95 \pm 1,98 (n = 19)	0,9892 ^a
PDTC ou ATC	62,00 \pm 4,29 (n = 18)	64,39 \pm 2,33 (n = 31)	0,9174 ^b

^aP-values calculados com o teste *t-Student*. ^bP-value calculado com o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

O teste da correlação entre o número de mutações e a idade de manifestação dos PDTC ou ATC não foi significativo (Tabela III.19).

Para testar se existiam diferenças entre o tempo de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC sem mutações e os doentes com 1 ou mais mutações, construíram-se curvas de sobrevivência global pelo método de *Kaplan-Meier*, (Figura III.8).

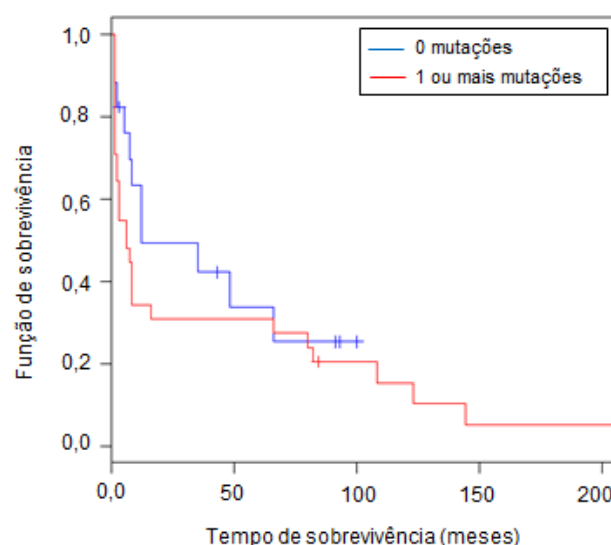


Figura III.8 – Curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC, com 0 mutações (n = 17) vs 1 ou mais mutações (n = 31). $P = 0,3117$ calculado pelo teste de *Log-rank*.

As curvas de sobrevivência global dos doentes com PDTC ou ATC com 0 mutações vs 1 ou mais mutações, não apresentaram diferenças significativas ($P = 0,3117$) (Figura III.8).

Colocou-se ainda a hipótese de que o número de mutações num tumor poderia influenciar o seu tamanho, a invasão dos gânglios linfáticos ou a metastização à distância. No entanto, não se obtiveram resultados estatisticamente significativos (resultados não apresentados).

IV. Discussão

Os PDTC e ATC são as neoplasias mais agressivas da tiróide. Os PDTC representam cerca de 7% (DeLellis *et al.*, 2004) e os ATC 1-2% (Taccaliti *et al.*, 2012) dos carcinomas derivados do epitélio folicular da tiróide. Apesar de surgirem numa frequência relativamente baixa, estes tipos de carcinomas são a causa de morte de um elevado número de doentes com carcinomas da tiróide, especialmente os ATC, que estão associados a 14-39% de mortalidade por cancro da tiróide. A taxa de mortalidade dos doentes com ATC é particularmente elevada (> 90%) e a sobrevivência média é de apenas 6 meses após o diagnóstico (DeLellis *et al.*, 2004). Em geral, os PDTC e ATC não são sensíveis às terapias convencionais, utilizadas para tratar os tumores bem diferenciados (WDTC). Têm sido realizados diversos ensaios clínicos com alguns resultados positivos (ver secção I.6), mas permanece por identificar uma terapia eficaz. A caracterização das alterações moleculares em PDTC e ATC poderá ser muito importante para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas direccionadas a alvos específicos.

Nos últimos anos, têm sido realizados diversos estudos de pesquisa de mutações em genes supressores e oncogenes em séries de PDTC e/ou ATC. Os genes mutados com maior frequência nestes tipos de tumores incluem o gene *TP53* (26% dos PDTC e 47-86% dos ATC) (Ito *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2011), *N-RAS* (18-55% dos PDTC e 4-60% dos ATC) (Soares *et al.*, 2011), *BRAF* (10-44% de ATC com focos de PTC e 14,3% em ATC sem focos de WDTC) (Takano *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2011), *CTNNB1* (25% dos PDTC e 65% dos ATC) (Garcia-Rostan *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2011), *PIK3CA* (12-23% dos ATC) (Garcia-Rostan *et al.*, 2005), *PTEN* (17% dos ATC) (Liu *et al.*, 2008), *APC* (9% dos ATC) e *AXIN1* (81,8% dos ATC) (Kurihara *et al.*, 2004). No entanto, na maioria destes estudos, para cada série de tumores pesquisaram-se mutações em apenas um gene, ou num pequeno grupo de genes.

Com o objectivo de identificar novos alvos terapêuticos, o nosso grupo realizou um estudo, utilizando *microarrays* de oligonucleótidos, dos níveis de expressão génica globais dos tumores da tiróide e de tiróide normal, e identificaram-se assinaturas moleculares para os PDTC e ATC. Estas assinaturas moleculares são comuns aos dois tipos de tumores, e envolvem genes relacionados com a proliferação celular, ciclo celular, adesão celular e metastização.

Neste projecto, realizou-se um estudo abrangente, englobando os diferentes genes mutados com maior frequência nos PDTC e ATC e genes seleccionados com base nas assinaturas moleculares e funções celulares mais alteradas nestes tumores. Esta análise global poderá ser relevante para o desenvolvimento de novas terapêuticas mais direccionadas.

Foram seleccionados: a) genes envolvidos na regulação do ciclo celular, como o supressor de tumor *TP53* (p53) e os CKI *CDKN2A* (p14^{ARF}, p16^{INK4A}), *CDKN1A* (p21^{WAF1/CIP1}), *CDKN2B* (p15^{INK4B}), *CDKN1B* (p27^{KIP1}) e *CDKN2C* (p18^{INK4C}); b) genes envolvidos na adesão celular, EMT e invasão: *CTNNB1* (β-catenina) e *AXIN1* (Axina-1); c) os proto-oncogenes *H-*, *K-* e *N-RAS*, *BRAF* e *PIK3CA*, cujo envolvimento no desenvolvimento de WDTC e/ou PDTC e ATC foi previamente descrito. Foi também realizado um estudo dos níveis de expressão do gene *SNAI2* (Slug), cujo aumento de

expressão se encontra relacionado com perda de adesão celular, aumento da capacidade de invasão e EMT.

Para a realização deste projecto estavam disponíveis amostras de 49 tumores primários (23 PDTC e 26 ATC) e 6 linhas celulares (2 de PDTC e 4 de ATC).

Gene *BRAF*

A proteína B-Raf é parte integrante da via MAPK-ERK, e um importante alvo de mutações em células tumorais. Nos tumores primários analisados neste trabalho, identificaram-se mutações no gene *BRAF* em 4% (1/23) dos PDTC e em 4% (1/24) dos ATC. Identificaram-se ainda mutações em 2 das 4 linhas celulares de ATC. Noutras séries de tumores, o gene *BRAF* encontra-se mutado, em média, em 20% de todos os tumores humanos analisados (COSMIC), sendo que mutações neste gene estão descritas em 10-44% dos ATC com focos de PTC (Soares *et al.*, 2011). Nestes casos, as mutações estão normalmente presentes em ambas as áreas, de PTC e ATC. Na presente série de tumores existiam apenas 2 casos de tumores com focos de PTC: 1 PDTC e 1 ATC. No entanto, nenhum destes casos apresentou mutações no gene *BRAF*. Num estudo realizado em 2007 na população japonesa, Takano e colaboradores identificaram mutações *BRAF*^{V600E} em 33,3% (3/9) de ATC com focos de PTC, 0% (0/4) de ATC com focos de FTC, e em 14,3% (1/7) de ATC sem componente bem diferenciada (Takano *et al.*, 2007). Apesar de a série estudada por Takano *et al.* possuir poucos casos de cada tipo de ATC, os resultados sugerem que a ausência da componente bem diferenciada poderá ser uma explicação para a baixa frequência de mutações encontrada nessa série e na série do presente projecto.

Na pesquisa realizada neste trabalho, para além da mutação V600E, identificada em 3 ATC (2 linhas celulares e 1 tumor primário), identificou-se uma mutação *missense* no codão 598, e uma mutação *nonsense* no codão 609 (Figura IV.1). As duas mutações coexistem no mesmo tumor, embora não tenha sido esclarecido se ocorreram no mesmo alelo ou em alelos separados. A mutação p.Ala598Thr foi previamente identificada como somática numa série de melanomas (Deichmann *et al.*, 2006) e a mutação p.Gln609X (Tie *et al.*, 2011), numa série de carcinomas colorectais.

Todas as mutações identificadas neste gene estão localizadas no domínio de cinase da proteína (Figura V.1), essencial para que a proteína exerça a sua função na via ERK. Têm sido realizados vários estudos funcionais com linhas celulares de tiróide com a mutação *BRAF*^{V600E}, nomeadamente a linha celular de ATC 8505c (Nucera *et al.*, 2010), que comprovaram a patogenicidade desta mutação. Em relação às outras mutações identificadas, não foram realizados estudos funcionais, mas segundo a previsão realizada *in silico*, o seu efeito também será patogénico uma vez que os resíduos de aminoácidos que sofreram mutação são importantes na activação constitucional da proteína B-Raf oncogénica.



Figura IV.1 - Localização das mutações identificadas no gene *BRAF*. RBD – Domínio de ligação da Ras; C1 – Domínio rico em resíduos de cisteína; KD – Domínio de cinase. Os traços mais espessos representam mutações que ocorreram mais do que 1 vez. — Mutação *missense*; - - - Mutação *nonsense*.

Genes *N*-, *H*- e *K*-RAS

As proteínas da família Ras (*N*-, *H*- e *K*-Ras) estão envolvidas na activação das vias de sinalização MAPK-ERK e PI3K/Akt, pelo que representam também um alvo preferencial para mutações em cancro. Nos tumores primários analisados neste trabalho, identificaram-se mutações no codão 61 do gene *N*-RAS em 17% (4/23) dos PDTC e 28% (7/25) dos ATC, e ainda no codão 61 do gene *H*-RAS em 4% (1/26) dos ATC. Foi também identificada uma mutação no codão 13 do gene *H*-RAS numa linha celular de ATC (Figura IV.2). As mutações identificadas foram todas do tipo *missense*, e a mais frequente foi a mutação p.Gln61Arg, ocorrendo em 10 casos. Em 2 outros casos a mutação também ocorreu no codão 61, mas o resíduo de aminoácido Gln foi substituído pelo resíduo de aminoácido Lys. Numa linha celular, ocorreu a mutação p.Gly13Arg.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos previamente realizados em que se verificou que as mutações nestes genes ocorrem preferencialmente nos codões 12, 13 e 61, localizados em regiões homólogas do domínio de GTPase dos genes *RAS*. As mutações nesta região mantêm as proteínas no seu estado activo (Legakis e Syrigos, 2011). Existem evidências de que nos tumores mais agressivos da tiróide, as mutações ocorrem quase exclusivamente no codão 61 do gene *N*-RAS, e estão presentes em 18-55% dos PDTC e 4-60% dos ATC (Soares *et al.*, 2011), estando associadas à progressão tumoral e ao comportamento mais agressivo (Legakis e Syrigos, 2011).

García-Rostan e colaboradores realizaram um estudo de pesquisa de mutações nos genes *RAS* em WDTC, PDTC e ATC e correlacionaram as mutações com características clínico-patológicas dos doentes. Observaram que as mutações nestes genes estavam associadas a um mau prognóstico, nos vários tipos de tumor (Garcia-Rostan *et al.*, 2003).

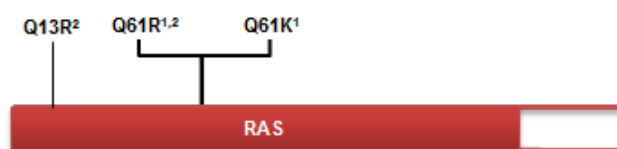


Figura IV.2 - Localização das mutações identificadas nos genes *N*- e *H*-RAS. RAS – Domínio de Ras-GTPase. ¹Mutação no gene *N*-RAS; ²Mutação no gene *H*-RAS. Os traços mais espessos representam mutações que ocorreram mais do que 1 vez. — Mutação *missense*

A identificação de mutações nos genes *BRAF* e *RAS* sugere que a via de sinalização MAPK-ERK tem um papel importante no desenvolvimento de PDTC e ATC. Nesta série de tumores, as mutações nestes genes ocorreram de forma mutuamente exclusiva, estando os resultados em acordo com outros estudos (Nikiforov, 2011).

Gene *TP53*

O gene supressor de tumor *TP53* é o alvo de mutação mais frequente, encontrando-se mutado em mais de 50% dos cancros humanos. Na presente série de tumores, foram identificadas mutações em 22% (5/23) dos PDTC, e em 42% (11/26) dos ATC. Foram também identificadas mutações em 2 linhas celulares de ATC. Noutras séries de PDTC e ATC foram identificadas mutações em 26% dos PDTC (Soares *et al.*, 2011), e 47-86% dos ATC (Ito *et al.*, 1992; Donghi *et al.*, 1993; Fagin *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2007). Os resultados obtidos neste projecto estão de acordo com os resultados obtidos noutras séries de tumores.

As mutações identificadas no presente estudo foram maioritariamente monoalélicas do tipo *missense*, como era esperado (Brosh e Rotter, 2009) (Figura IV.3). Para além de mutações *missense*, identificaram-se mutações do tipo *frameshift* (p.Lys291Asnfs*49), num PDTC e *nonsense* (p.Ser183X), num ATC, e numa linha celular de ATC. Todas as mutações foram previamente descritas, excepto a mutação p.Lys291Asnfs*49. As mutações p.Arg248Gln, p.Arg248Trp e p.Arg273Cys foram previamente identificadas em ATC, e as restantes em vários tipos de carcinomas (*e.g.* mama e colorectal).

Todas as mutações ocorreram no DBD, o que impede a p53 de se ligar aos seus genes-alvo e exercer a sua função de supressão tumoral. Estudos funcionais em linhas celulares com algumas das mutações comprovaram o seu efeito patogénico. A análise *in silico* sugeriu também um efeito patogénico para as restantes mutações. Sendo um supressor de tumor, o gene *TP53* necessita de uma inactivação bialélica para deixar de exercer a sua função. Quando ocorrem mutações do tipo *missense*, a proteína mutante exerce frequentemente um efeito dominante negativo sobre a *wt*. Na presença de mutações que originam proteínas truncadas (*nonsense* ou *frameshift*), o mais provável é que o alelo *wt* seja inactivado por LOH.

As mutações no *TP53* ocorreram quase totalmente em amostras com *RAS* e *BRAF* *wt*, sendo que estas mutações coexistiram, em apenas 1 dos 19 (5%) casos com mutações nos genes *TP53*, *RAS* ou *BRAF*. Desta forma, testou-se a hipótese de mútua exclusividade entre as mutações no gene *TP53* e as mutações nos genes *RAS* ou *BRAF*, tendo-se obtido significado estatístico ($P = 0,0193$). No entanto, em duas séries de ATC, em que foram realizadas pesquisas de mutações nos genes *TP53*, *RAS* e *BRAF*, observou-se uma associação das mutações *RAS* ou *BRAF* com mutações no gene *TP53* em 19% (3/12) (Wang *et al.*, 2007) e em 85% (6/7) (Quiros *et al.*, 2005) dos casos com mutações nestes genes. As discrepâncias entre os resultados obtidos na presente série de tumores, e nas outras séries, poderão ser devidas ao número e tipo de ATC estudados, ou a limitações técnicas. Esta associação poderá ocorrer mais frequentemente em ATC com focos de WDTC, como sucede na maioria dos tumores estudados por Quiros *et al.* Por outro lado, Quiros e colaboradores utilizaram IHC para determinar o estado da p53. Este método pode originar falsos-positivos, não sendo tão preciso como a sequenciação. As funções dos genes activados pela p53 mutada com GOF, ou pelo Ras oncogénico, são bastante semelhantes, o que poderá justificar a mútua exclusividade sugerida pelos resultados do presente trabalho.

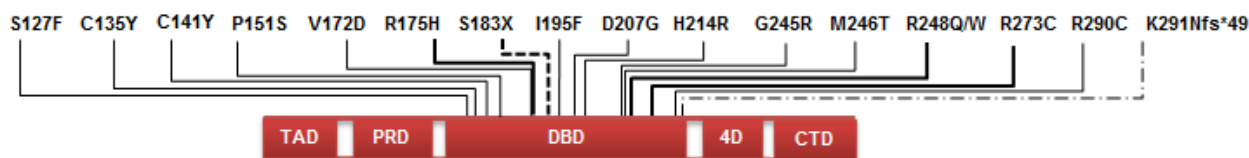


Figura IV.3 - Localização das mutações identificadas no gene *TP53*. TAD – Domínio de transactivação; PRD – Domínio rico em resíduos de prolina; DBD – Domínio de ligação ao DNA; 4D – Domínio de tetramerização; CTD – Domínio de regulação da região terminal-C; Os traços mais espessos representam mutações que ocorreram mais do que 1 vez. — Mutações *missense*; - - - - Mutações *nonsense*; - · - · - Mutações *frameshift*.

Gene *PIK3CA*

Os componentes da via PI3K/Akt são frequentemente alvo de mutações em células tumorais. As proteínas Ras mutadas podem activar constitutivamente esta via, mas também é frequente a ocorrência de mutações nos genes *PTEN*, inactivando este inibidor da via, e no *PIK3CA*, activando a proteína constitutivamente. Nos tumores primários analisados neste projecto, foram identificadas mutações no gene *PIK3CA* em 13% (3/23) dos PDTC, e em 4% (1/26) dos ATC. Para além disso foi identificada uma mutação numa linha celular de ATC (Figura IV.4). Nas séries de tumores estudadas anteriormente, foram obtidos resultados controversos, sendo que em algumas séries não foram identificadas quaisquer mutações (Wu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007), e noutras séries foram identificadas mutações em 6% dos PDTC (Ricarte-Filho *et al.*, 2009), e mutações em 6-23% dos ATC (Garcia-Rostan *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2007; Ricarte-Filho *et al.*, 2009).

As mutações identificadas em estudos anteriores estão localizadas preferencialmente nos exões 1 (domínio de ligação à proteína p85), 9 (domínio helicoidal) e 20 (domínio de cinase) do gene. No presente estudo, identificaram-se 2 mutações somáticas em PDTC, no exão 1, p.Pro57Ser e p.Glu85Lys, que permitirão, por parte da p85, a aquisição de independência dos sinais do receptor, para activar a subunidade catalítica. Estas mutações não foram identificadas em estudos anteriores. No exão 9 identificou-se 1 mutação num ATC, p.Glu542Lys, também presente numa linha celular de ATC. Esta mutação foi previamente identificada em ATC (Garcia-Rostan *et al.*, 2005), e o seu efeito funcional estudado *in vitro* em cancro colorectal (Ikenoue *et al.*, 2005) e *in vivo* (Bader *et al.*, 2006). No exão 20, identificaram-se 3 mutações em PDTC, 2 do tipo *nonsense* (p.Trp1057X e p.Glu1034X), e 1 do tipo *missense* (p.Pro1011Leu). As 2 mutações *nonsense* do exão 20 coexistiam com as 2 mutações identificadas no exão 1. Este achado poderá ter como base o facto de a PI3K- α mutante no domínio cinase, necessitar da acção da p85 para adquirir funções oncogénicas (Zhao e Vogt, 2008). Com mutação nos domínios de ligação à p85, e de cinase, as proteínas ficarão totalmente independentes de sinais extracelulares. A mutação p.Trp1057X foi previamente identificada em carcinomas gástricos (Shi *et al.*, 2012). A análise *in silico* do efeito de todas as mutações identificadas na função da proteína, indicou que terão um efeito patogénico. A ausência das mesmas a nível germinal corrobora esta previsão.

Neste estudo, as mutações no gene *PIK3CA* ocorreram de forma mutuamente exclusiva com as mutações nos genes *RAS*, e coexistiram com as mutações identificadas no gene *BRAF* em 2 tumores primários com *BRAF mut* e numa linha celular. As mutações nos genes *RAS* ou *PIK3CA* e *BRAF*

ocorreram em 35% (8/23) dos PDTC, e 35% (9/26) dos ATC. A coexistência de mutações nos genes da via PI3K/Akt, nomeadamente no gene *PIK3CA*, com mutações no gene *BRAF*, tem sido associada quase exclusivamente a PDTC e ATC (Hou *et al.*, 2007; Ricarte-Filho *et al.*, 2009). Em WDTC, estas mutações são habitualmente mutuamente exclusivas (Hou *et al.*, 2007). Noutros estudos, a activação simultânea das vias MAPK-ERK e PI3K/Akt foi identificada em 81% dos ATC (Legakis e Syrigos, 2011). As diferenças desta frequência relativamente à do presente estudo, poderão ser devidas ao estudo de outros genes da via PI3K/Akt, como o próprio *AKT*, ou o *PTEN*. Será interessante estudar futuramente esses genes na presente série de tumores.

Os resultados obtidos sugerem que as vias PI3K/Akt e MAPK-ERK poderão ter um efeito importante, e possivelmente sinérgico no desenvolvimento dos PDTC e ATC.



Figura IV.4 - Localização das mutações identificadas no gene *PIK3CA*. p85 BD – Domínio de ligação da p85; RBD – Domínio de ligação da Ras; C2 – Domínio de ligação a Ca^{2+} ; Helicoidal – Domínio helicoidal; KD – Domínio de cinase. Os traços mais espessos representam mutações que ocorreram mais do que 1 vez. — Mutações *missense*; ---- Mutações *nonsense*.

Genes *CTNNB1* e *AXIN1*

As mutações no gene *CTNNB1* têm sido associadas a vários tipos de carcinomas, nomeadamente, carcinomas colorectais, da paratiróide e hepatocelulares. No presente estudo, foi identificada apenas 1 mutação num PDTC (5%), p.Glu55Lys (Figura IV.5). A análise *in silico* indicou que poderá ter um efeito patogénico. Em tiróide, as mutações neste gene têm sido associadas aos tumores mais agressivos. No entanto, a presença de mutações neste gene tem sido controversa. García-Rostan e colaboradores (García-Rostan *et al.*, 1999) identificaram mutações em 61% de ATC, enquanto que noutra série de 22 ATC da população Japonesa foi identificada apenas 1 mutação (4,5%) (Kurihara *et al.*, 2004), e numa série de 17 PDTC também não foram identificadas quaisquer mutações (Rocha *et al.*, 2003). A diferença entre os resultados poderá ter origem na heterogeneidade entre séries de tumores, mas poderá também resultar de problemas técnicos na identificação das mutações.

Devido à importância que a activação da via de sinalização Wnt possui, em vários tipos de carcinomas, colocou-se a hipótese de que outro gene desta via se poderia encontrar mutado, e ser responsável pela sua activação. Procedeu-se ao estudo de mutações no gene *AXIN1*, codificante da proteína Axina-1, parte integrante do complexo de destruição da β -catenina, tendo como base a elevada frequência de mutações (81,8%) identificada em ATC, por Kurihara e colaboradores (Kurihara *et al.*, 2004). No presente estudo foram identificadas apenas duas variantes neste gene, uma em PDTC (p.Arg349His), e outra em ATC (p.Asp257Asn) (Figura IV.6). Estas variantes não foram descritas anteriormente nos diversos tipos de carcinomas estudados, *e.g.* ATC. No entanto,

detectou-se a sua presença também a nível germinal. Previu-se ainda *in silico* o efeito destas variantes na função da proteína, e ambas terão um efeito benigno, pois localizam-se em regiões pouco conservadas entre espécies. Serão necessários estudos funcionais para caracterizar o efeito destas alterações.

Os resultados obtidos não apoiam a hipótese do envolvimento da via Wnt no desenvolvimento de PDTC e ATC. Para esclarecer qual o papel da via Wnt no desenvolvimento destes tumores, serão necessários estudos adicionais de outros componentes da via, como o gene APC, envolvido em vários tipos de carcinomas, nomeadamente, em 9% de ATC (Kurihara *et al.*, 2004). É no entanto interessante observar que no estudo por *microarrays* que antecedeu este projecto, se identificou um aumento da expressão do gene *MYC*, um alvo importante desta via.



Figura IV.5 - Localização da mutação identificada no gene *CTNNB1*. US – Local de ubiquitinação; ARM – Repetições *Armadillo*; TAD – Domínio de transactivação. — Mutação *missense*.

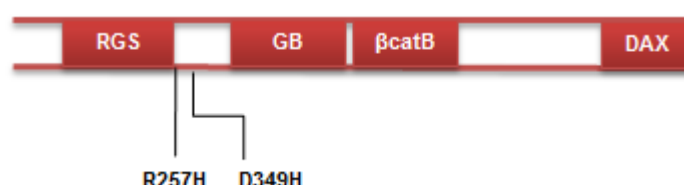


Figura IV.6 - Localização das variantes identificadas no gene *AXIN1*. RGS – Domínio de regulação da sinalização da proteína G; GB – Local de ligação da GSK-3β; βcatB – Local de ligação da β-catenina; DAX – Domínio presente na proteína *Dishevelled* e Axina-1. As variantes indicadas na parte inferior do esquema estavam presentes a nível germinal. — Variante *missense*.

Genes que codificam CKIs

Os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs) possuem um papel importante na regulação do ciclo celular e proliferação. Têm sido realizados vários estudos com o intuito de compreender o seu envolvimento em diversos tipos de cancro. Na presente série de tumores identificaram-se mutações no gene *CDKN2A* em 15% dos PDTC (3/20), localizadas na região codificante das proteínas p14^{ARF}/p16^{INK4A}, 5% (1/22) dos ATC, sendo a mutação localizada na região codificante da p14^{ARF}, e numa linha celular de ATC (p14^{ARF}/p16^{INK4A}) (Figura IV.7); no gene *CDKN2B* identificaram-se mutações em 10% dos PDTC (2/20) (Figura IV.8); e no gene *CDKN2C* em apenas um ATC (6%) (Figura IV.9). Foi identificada uma deleção em homozigotia dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* na linha celular de ATC C643. Nos genes *CDKN1A* e *CDKN1B* não foram identificadas quaisquer mutações. A deleção dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* foi previamente descrita em linhas celulares da tiróide (Elisei *et al.*, 1998). As mutações identificadas não foram descritas em estudos anteriores. Os estudos de pesquisa de mutações nestes genes publicados são raros, e nos

existentes, as séries de tumores primários são pequenas. Foram descritas mutações no gene *CDKN2A* em 20% de ATC (1/5), e a deleção deste gene em 2 casos de ATC (Tung *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2008). Até ao momento, no gene *CDKN2B* não tinham sido identificadas mutações pontuais em PDTC e ATC. Nos restantes genes codificantes de CKI, não foram realizadas pesquisas de mutações em PDTC e ATC, apenas estudos de expressão.

No gene *CDKN2A*, as variantes identificadas nos PDTC afectam os codões 53 (p.Met53Ile), 146 (p.Asp146Asn) e 149 (p.Glu149Lys) da p16^{INK4A}, e o codão 68 (p.Asp68Asn) da p14^{ARF}. A previsão do efeito destas variantes na função da proteína, realizada *in silico*, indicou que a variante no codão 53 da região codificante da p16^{INK4A}, e a variante no codão 68 da região codificante da p14^{ARF} serão possivelmente patogénicas, mas que as variantes nos codões 146 e 149 serão benignas. Este resultado poderá ser devido à ausência de sequências de outras espécies, para comparação. Estas variantes estavam ausentes a nível germinal, pelo que foram consideradas potencialmente patogénicas na análise dos resultados. A mutação identificada no ATC (p.Met1Ile) afecta o codão de iniciação da p14^{ARF}. A previsão do seu efeito funcional, realizada *in silico*, indicou que se trata de uma alteração possivelmente patogénica. Não foi possível analisar o tecido normal desta amostra, pois não se encontrava disponível. A mutação p.Leu63Arg identificada no gene *CDKN2A* na linha celular de ATC T238, encontrava-se presente no tumor do doente, a partir do qual se estabeleceu a linha celular, e ausente no tecido normal do doente. A previsão *in silico* do seu efeito corroborou a hipótese de a alteração ser patogénica.

As variantes no gene *CDKN2B* localizaram-se nos codões 8 (p.Met8Ile), 21 (p.Ala21Val) e 37 (p.Gly37Ser). Estas variantes não foram identificadas em estudos anteriores. As variantes p.Ala21Val e p.Gly37Ser foram consideradas patogénicas pela previsão realizada *in silico*, enquanto que a variante p.Met8Ile foi considerada benigna, devido à não conservação do resíduo de aminoácido ao longo da evolução. Será necessário analisar o tecido normal do doente para verificar se está presente a nível germinal.

No gene *CDKN2C* foi identificada uma variante do tipo *inframe* com a deleção de um resíduo de aminoácido (p.Glu99del). De acordo com a previsão do seu efeito realizada *in silico*, a alteração é possivelmente patogénica. Esta variante não foi identificada em estudos anteriores.

A inactivação dos CKI parece estar envolvida no aparecimento de uma pequena percentagem de PDTC e ATC, sendo que aparenta ter um maior envolvimento em PDTC do que em ATC (15% vs 5% nos tumores primários, respectivamente). Por outro lado, é interessante observar que em ATC e PDTC primários, as mutações no gene *CDKN2A* surgem frequentemente associadas a mutações noutros genes (e.g. *RAS*, *TP53* e/ou *PIK3CA*). Apesar de o número de observações ter sido demasiado pequeno para permitir análise estatística de associações entre as mutações nos diferentes genes estudados, observou-se que em PDTC, os 3 casos com mutação no *CDKN2A* também possuem mutação no gene *PIK3CA*, e que o mesmo não acontece para as mutações no gene *CDKN2B*.

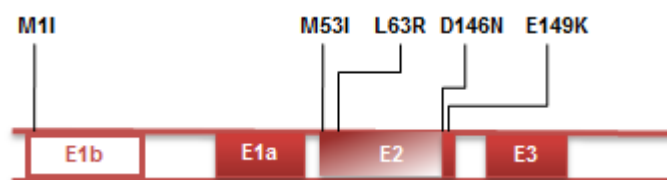


Figura IV.7 - Localização das mutações identificadas no gene *CDKN2A*. A vermelho estão representados as regiões codificantes da proteína p16^{INK4A}; A branco estão representados as regiões codificantes da proteína p14^{ARF}. Uma parte do exão 2 (E2) é comum a ambas. E – Exão; — Mutações *missense*.



Figura IV.8 - Localização das variantes identificadas no gene *CDKN2B*. E – Exão. *O significado da variante p.Met8Ile permanece desconhecido; — Mutações *missense*.

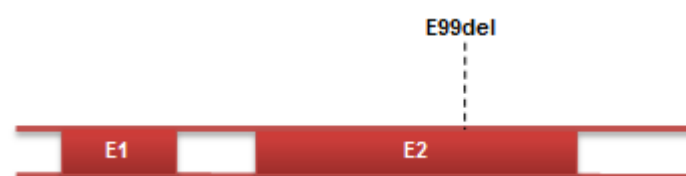


Figura IV.9 - Localização da mutação identificada no gene *CDKN2C*. E – Exão. ---- Deleção *inframe*.

Gene *SNAI2*

No estudo dos níveis de expressão génica globais dos tumores da tiróide, realizado pelo nosso grupo, utilizando *microarrays* de oligonucleótidos, observou-se que vários componentes da via de sinalização do TGF- β se encontravam sobre-expressos, incluindo o ligando TGF- β , o TGFBR1 e o LTBP1, envolvidos na activação da via, e também vários alvos da via, *e.g.* *SNAI2*, envolvido na EMT, invasão e metastização. Seleccionou-se o gene *SNAI2* para validação por qPCR, e analisaram-se amostras de tiróide normal, FTC, fvPTC, PTC, e amostras de PDTC e ATC em que foi possível obter RNA. Observou-se uma sobre-expressão significativa, nos ATC, em relação aos PDTC ($P < 0,001$) e à tiróide normal ($P < 0,05$). No entanto, essa sobre-expressão estava apenas presente em 8 de 19 ATC. Estes resultados sugeriram um possível envolvimento da via de sinalização do TGF- β no desenvolvimento de um subgrupo de ATC.

Identificação de polimorfismos

No processo de pesquisa de mutações, identificaram-se algumas variantes comuns na população. A maioria das frequências identificadas encontrava-se em concordância com as frequências identificadas na população Europeia (HapMap e 1000Genomes, NCBI). No entanto, observou-se uma frequência mais elevada do polimorfismo no gene *H-RAS* (c.81T>C) nesta série de tumores (67,9%) quando comparado com a população Europeia (29,6%). Foi publicado um estudo no qual se identificou que a frequência do polimorfismo era 62% numa série de doentes com FTC,

encontrando-se associada a uma maior fracção de células em fase S, e à aneuploidia nestes tumores, podendo induzir uma maior instabilidade genómica (Castro *et al.*, 2006).

Observou-se também uma menor frequência do polimorfismo -191G>A no gene *CDKN2A*, e uma frequência mais elevada dos polimorfismos nos genes *CDKN1A* (p.Asp83Gly) e *CDKN1B* (p.Val109Gly), por comparação com as frequências na população Europeia. Em relação aos polimorfismos nos genes *CDKN1A* e *CDKN2A*, de acordo com o nosso conhecimento, não existem estudos relativamente à sua relevância em cancro. O polimorfismo p.Val109Gly do gene *CDKN1B*, foi anteriormente associado à progressão e maior agressividade dos carcinomas medulares da tiróide (Pasquali *et al.*, 2011). A elevada percentagem deste polimorfismo, presente na série de PDTC e ATC poderá sugerir um papel semelhante para este polimorfismo, nestes tumores. No entanto, o número de casos da presente série não é suficiente para realizar estudos de associação.

Correlação das mutações com aspectos clínico-patológicos dos doentes

Efectuou-se uma análise da correlação dos aspectos clínico-patológicos dos doentes com o diagnóstico PDTC vs ATC.

Observou-se que a idade no diagnóstico dos doentes com PDTC (idade média \pm DP = 56,22 \pm 3,61) era significativamente inferior à idade de diagnóstico dos doentes com ATC (idade média \pm DP = 69,96 \pm 1,67) ($P = 0,0016$). Já foi extensamente descrito na literatura que os carcinomas mais agressivos surgem em idades mais avançadas do que os carcinomas menos agressivos (DeLellis *et al.*, 2004).

Construíram-se curvas de sobrevivência para os doentes com PDTC vs ATC, e obtiveram-se diferenças significativas, sendo que os PDTC apresentaram um tempo de sobrevivência global superior ao dos doentes com ATC ($P = 0,0001$). Este aspecto também se encontra bem definido, uma vez que os ATC apresentam um crescimento muito rápido, e estes doentes vêm a falecer, muitas vezes, por obstrução das vias respiratórias.

Efectuou-se uma análise da correlação entre as mutações identificadas nos diferentes genes e diversos aspectos clínico-patológicos dos doentes.

Foram analisadas as mutações nos genes *TP53*, *RAS* e *BRAF*, uma vez que são as que ocorrem com maior frequência (*TP53* e *RAS*) e/ou activam a via MAPK (*BRAF* e *RAS*). As restantes mutações detectadas apresentavam frequências baixas, não permitindo a realização de análise estatística.

Construíram-se as seguintes curvas de sobrevivência global para os doentes com PDTC e ATC: a) *TP53 mut* vs *TP53 wt* e *RAS wt* e *BRAF wt*; b) *RAS mut* ou *BRAF mut* vs *TP53 wt* e *RAS wt* e *BRAF wt*. Observou-se que os doentes com *TP53 mut* sobreviveram menos tempo do que os doentes com os genes *TP53 wt*, *RAS wt* e *BRAF wt* ($P = 0,0193$). A sobrevivência global dos doentes com *RAS mut* ou *BRAF mut* foi semelhante à dos doentes com *TP53 wt*, *RAS wt* e *BRAF wt* ($P = 0,1648$). No entanto, devido ao reduzido número de observações, deverão ser mantidas algumas reservas relativamente a estes resultados.

Analisou-se a correlação de: a) presença de mutações nos genes *TP53* ou *RAS* ou *BRAF*; b) número de mutações (0 mutações vs 1 ou mais mutações), com os seguintes parâmetros clínico-patológicos: idade no diagnóstico, tamanho do tumor, invasão ganglionar e metastização à distância, na série de ATC e PDTC. No entanto, nenhum destes testes foi significativo, pelo que não existem evidências da existência de uma correlação entre as mutações nestes genes e os aspectos clínico-patológicos referidos.

Analisou-se ainda a correlação entre mutações nos genes *TP53*, *RAS* ou *BRAF* e o tempo de sobrevivência global dos doentes com PDTC e ATC, construindo curvas de sobrevivência pelo método de *Kaplan-Meier* e utilizando o teste de comparação de *Log-rank*. O teste foi estatisticamente significativo ($P = 0,0222$), indicando que existiam evidências a favor de que os doentes com PDTC ou ATC com mutações nos genes *TP53*, *RAS* ou *BRAF* possuem um menor tempo de sobrevivência global do que aqueles com estes genes *wt*. Este resultado poderá ser relevante para melhorar a eficácia do prognóstico dos doentes com este tipo de carcinomas, e desta forma uma melhor adequação do tratamento.

Foi também analisada a correlação entre o número de mutações nos diferentes genes (0 mutações vs 1 ou mais mutações), e a idade no diagnóstico, tamanho do tumor, invasão ganglionar e metastização à distância. Testaram-se estas associações para os doentes com PDTC ou ATC, separadamente e em conjunto. No entanto, em nenhuma das análises se obteve significado estatístico. Testou-se ainda a correlação entre o número de mutações e a sobrevivência dos doentes com PDTC e ATC, mas não foram identificadas diferenças com significado estatístico.

Não foi possível realizar outros testes de sobrevivência devido ao baixo número de observações. Os outros resultados sem significado estatístico, poderão ter resultado da falta de informação acerca da presença de invasão ganglionar, ou tamanho do tumor, particularmente nos ATC, que muitas vezes não estava disponível nos processos clínicos.

Perspectiva global dos resultados

Os resultados deste projecto sugerem o envolvimento das vias de sinalização MAPK-ERK, PI3K-Akt e TGF- β , no desenvolvimento de PDTC e ATC, sendo que a via de sinalização do TGF- β poderá estar envolvida predominantemente nos ATC. Identificou-se ainda nestes tumores, a inactivação de proteínas essenciais para a regulação da proliferação e adesão celular (p53, p14^{ARF}, p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, β -catenina e Slug).

Na Figura IV.10 encontram-se sumarizados esquematicamente os resultados obtidos neste trabalho, como actualização do esquema apresentado na Figura I.4 da Introdução.

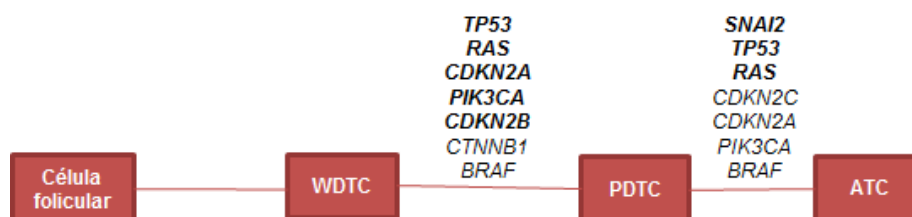


Figura IV.10 - Representação esquemática dos resultados obtidos neste trabalho relativamente aos genes envolvidos no desenvolvimento de PDTC e ATC. A negrito encontram-se os genes envolvidos com maior frequência (> 10%).

Foram identificadas mutações em 63% (31/49) dos PDTC e ATC [PDTC 52% (12/23) e ATC 73% (19/26)].

Da presente série, permanecem por identificar mutações em 11 PDTC e 7 ATC. Neste sentido, como trabalho futuro, pretende-se aumentar a série de tumores, e a série de genes estudados, incluindo genes como o *APC*, *AKT* e *PTEN*.

Abordagens terapêuticas

A identificação das alterações moleculares nos PDTC e ATC é muito importante para o desenvolvimento de novas terapias, direccionadas a alvos específicos. Até ao momento, existem diversos compostos a serem testados em ensaios clínicos, que têm como alvos as vias de sinalização alteradas nestes tumores. Os compostos mais estudados em carcinomas da tiróide são inibidores de proteínas com actividade de tirosina cinase. Estas proteínas estão presentes nas vias MAPK-ERK e PI3K-Akt, como os receptores EGFR, VEGFR e RET, e a proteína B-Raf. Alguns destes compostos são o Gefitinib (EGFR), Imatinib (RET), Sorafenib (BRAF, VEGFR 1 e 2, RET), Vandetanib (VEGFR 2 e 3, RET, EGFR e translocações RET/PTC), Pazopanib (VEGFR 1-3), PLX4032 (BRAF V600E) e Sunitinib (VEGFR 1-3, RET e rearranjos RET/PTC) (Kapiteijn *et al.*, 2012).

A utilização da p53 mutante como alvo terapêutico também tem sido alvo de intenso estudo. Em cancro, a p53 pode estar inactivada directamente por mutação, ou por alterações nos seus reguladores Mdm2 (inibidor), ou p14^{ARF} (activador). Geralmente, a p53 mutada perde parcialmente o seu *folding* no DBD, essencial para a ligação aos alvos com funções de supressão tumoral. Existem diversos compostos que devolvem o *folding*, e reactivam a proteína, que regressa à sua conformação *wt*. Alguns destes compostos são os CP-31398, p53R3, CDB3, PhiKan083, PRIMA-1 e MIRA (Selivanova, 2010). Nos casos com p53 *wt*, as células tumorais possuem muitas vezes, outros mecanismos para inactivarem esta proteína. Estes mecanismos induzem muitas vezes uma maior frequência de ligação da Mdm2 à p53, inactivando-a. Estes tumores poderão ser tratados com compostos específicos que inibem a ligação do Mdm2 à p53. Alguns destes compostos são o nutlin3a, HLI98, MI-43 e RITA (Selivanova, 2010). Estes compostos podem utilizar-se, por exemplo, quando a p14^{ARF} se encontra inactivada, não recrutando a Mdm2, que, desta forma, se liga com maior frequência à p53, inibindo a sua função de supressora tumoral.

Para os PDTC e ATC com CKI mutados, poderá ser interessante explorar a utilização de compostos inibidores de CDK, que vão exercer função semelhante aos CKI inactivados. Estes compostos têm sido alvo de estudo em melanoma, onde a p16^{INK4A} se encontra frequentemente inactivada, e a via p16^{INK4A}/CDK/pRB se encontra sub-activada. Neste sentido, têm sido desenvolvidos diversos compostos inibidores de CDK, *e.g.* Flavopiridol, inibidor das CDK1, 2, 4 e 7, que promove a paragem do ciclo celular e apoptose em linhas celulares de cancro. No entanto em ensaios clínicos, este composto não se tem demonstrado eficaz (Chin *et al.*, 2006). Outros compostos como o UCN-01, Seliciclib (CYC202), e SNS-032 (Chin *et al.*, 2006) estão a ser testados em diversos tipos de tumor (<http://clinicaltrials.gov>) e poderão ser mais selectivos e eficazes.

Conclusões

Os resultados obtidos neste projecto de Mestrado proporcionaram uma perspectiva global sobre os genes possivelmente envolvidos no desenvolvimento de PDTC e ATC. Apesar de terem sido realizados anteriormente, estudos de pesquisa de mutações nos genes *RAS*, *BRAF*, *TP53*, *CTNNB1*, *AXIN1* e *PIK3CA* em PDTC e ATC, este estudo é o primeiro em que estes genes foram analisados em simultâneo, numa série significativa de 49 PDTC e ATC.

Este estudo revelou que existe heterogeneidade, relativamente à frequência de mutações encontrada em diferentes séries de tumores publicadas, em particular para os genes *CTNNB1* e *AXIN1*.

Para além do estudo de genes cujo envolvimento era já conhecido, pesquisaram-se mutações nos CKI, devido ao seu importante papel na regulação do ciclo celular e proliferação celular. Identificou-se o seu possível envolvimento em 10% (4/42) dos PDTC e ATC, pelo que serão alvos terapêuticos a considerar.

Este estudo mostrou que a p53 mutante e a activação da via MAPK-ERK (por mutação do *RAS* e *BRAF*) estavam envolvidas com maior frequência no desenvolvimento de PDTC e ATC. Para além disso observou-se que estas mutações ocorreram com mútua exclusividade, sendo que, em conjunto, estas vias estavam envolvidas no desenvolvimento de 43% (10/23) dos PDTC e de 73% (19/26) dos ATC. Desta forma, será importante utilizar terapias que tenham como alvos a p53 mutada e a via MAPK-ERK, principalmente nos doentes com ATC.

Observou-se ainda que a activação simultânea das vias MAPK-ERK e PI3K/Akt estava envolvida no desenvolvimento de 35% (8/23) dos PDTC, e 35% (9/26) dos ATC, confirmando a importância destas vias como alvos terapêuticos nos doentes com PDTC e ATC.

A sobre-expressão do gene *SNAI2* também se revelou importante no desenvolvimento de 40% (8/20) dos ATC. Desta forma, deverá ser considerada uma terapia que envolva a inibição dos efeitos oncogénicos da via de sinalização do TGF- β .

Deste trabalho resultam ainda evidências de que os doentes com PDTC ou ATC que possuem mutações nos genes *RAS* ou *BRAF* ou *TP53*, têm um tempo de sobrevivência global inferior ao dos doentes com estes genes *wt.*, o que poderá ter interesse no prognóstico para estes doentes.

A presente caracterização molecular de PDTC e ATC poderá ser útil para a selecção de agentes terapêuticos mais direccionados, que poderão resultar numa maior eficácia do tratamento.

V. Bibliografia

- Adorno, M., M. Cordenonsi, M. Montagner, S. Dupont, C. Wong, B. Hann, A. Solari, S. Bobisse, M. B. Rondina, V. Guzzardo, A. R. Parenti, A. Rosato, S. Bicciato, A. Balmain e S. Piccolo.2009. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* 137(1): 87-98.
- Alsner, J., S. B. Sorensen e J. Overgaard.2001. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 59(2): 179-185.
- Alves, C. C., F. Carneiro, H. Hoeffler e K. F. Becker.2009. Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci* 14: 3035-3050.
- Audrezet, M. P., M. Robaszkiewicz, B. Mercier, J. B. Noursbaum, J. P. Bail, E. Hardy, A. Volant, P. Lozac'h, J. F. Charles, H. Goueron e et al.1993. TP53 gene mutation profile in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 53(23): 5745-5749.
- Bader, A. G., S. Kang e P. K. Vogt.2006. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5): 1475-1479.
- Bierie, B. e H. L. Moses.2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6(7): 506-520.
- Bjorklund, P., D. Lindberg, G. Akerstrom e G. Westin.2008. Stabilizing mutation of CTNNB1/beta-catenin and protein accumulation analyzed in a large series of parathyroid tumors of Swedish patients. *Mol Cancer* 7: 53.
- Bourdon, J. C.2007. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 97(3): 277-282.
- Boyault, S., Y. Drouet, C. Navarro, T. Bachelot, C. Lasset, I. Treilleux, E. Tabone, A. Puisieux e Q. Wang.2012. Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 132(1): 29-39.
- Brosh, R. e V. Rotter.2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9(10): 701-713.
- Canepa, E. T., M. E. Scassa, J. M. Ceruti, M. C. Marazita, A. L. Carcagno, P. F. Sirkin e M. F. Ogara.2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59(7): 419-426.
- Castro, P., P. Soares, L. Gusmao, R. Seruca e M. Sobrinho-Simoes.2006. H-RAS 81 polymorphism is significantly associated with aneuploidy in follicular tumors of the thyroid. *Oncogene* 25(33): 4620-4627.
- Cavaco, B. M., P. F. Batista, C. Martins, A. Banito, F. do Rosario, E. Limbert, L. G. Sobrinho e V. Leite.2008. Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc): analysis of fPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS mutations. *Endocr Relat Cancer* 15(1): 207-215.
- Chang, B. L., S. L. Zheng, S. D. Isaacs, K. E. Wiley, A. Turner, G. Li, P. C. Walsh, D. A. Meyers, W. B. Isaacs e J. Xu.2004. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Cancer Res* 64(6): 1997-1999.
- Chin, L., L. A. Garraway e D. E. Fisher.2006. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20(16): 2149-2182.
- Clark, D. P. e W. C. Faquin.2010. *Thyroid Cytopathology*. Nova Iorque, EUA, Springer-Verlag.
- Croce, C. M.2008. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358(5): 502-511.
- Crook, T., L. A. Brooks, S. Crossland, P. Osin, K. T. Barker, J. Waller, E. Philp, P. D. Smith, I. Yulug, J. Peto, G. Parker, M. J. Allday, M. R. Crompton e B. A. Gusterson.1998. p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2-associated breast tumours. *Oncogene* 17(13): 1681-1689.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton e P. A. Futreal.2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892): 949-954.
- De Felice, M. e R. Di Lauro.2004. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 25(5): 722-746.

- Deichmann, M., D. Krah, M. Thome, K. Wust, J. Hassanzadeh e B. Helmke.2006. The oncogenic B-raf V599E mutation occurs more frequently in melanomas at sun-protected body sites. *Int J Oncol* 29(1): 139-145.
- DeLellis, R. A., R. V. Lloyd, P. U. Heitz e C. Eng.2004. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, IARC Press.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath e W. Kolch.2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26(22): 3279-3290.
- Donghi, R., A. Longoni, S. Pilotti, P. Michieli, G. Della Porta e M. A. Pierotti.1993. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 91(4): 1753-1760.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler e B. Vogelstein.1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-825.
- Elisei, R., M. Shiohara, H. P. Koeffler e J. A. Fagin.1998. Genetic and epigenetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4b and p16INK4a in human thyroid carcinoma cell lines and primary thyroid carcinomas. *Cancer* 83(10): 2185-2193.
- Eriksen, J. G., J. Alsner, T. Steiniche e J. Overgaard.2005. The possible role of TP53 mutation status in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) with radiotherapy with different overall treatment times. *Radiother Oncol* 76(2): 135-142.
- Evans, J. J., H. S. Crist, S. Durvesh, R. D. Bruggeman e D. Goldenberg.2012. A comparative study of cell cycle mediator protein expression patterns in anaplastic and papillary thyroid carcinoma. *Cancer Biol Ther* 13(9).
- Fagin, J. A., K. Matsuo, A. Karmakar, D. L. Chen, S. H. Tang e H. P. Koeffler.1993. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91(1): 179-184.
- Fagman, H. e M. Nilsson.2011. Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol* 46(1): R33-42.
- Farid, N. R., Y. Shi e M. Zou.1994. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 15(2): 202-232.
- Ferru, A., G. Fromont, H. Gibelin, J. Guilhot, F. Savagner, J. M. Tourani, J. L. Kraimps, C. J. Larsen e L. Karayan-Tapon.2006. The status of CDKN2A alpha (p16INK4A) and beta (p14ARF) transcripts in thyroid tumour progression. *Br J Cancer* 95(12): 1670-1677.
- Fluge, O., O. Bruland, L. A. Akslen, J. R. Lillehaug e J. E. Varhaug.2006. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 16(2): 161-175.
- Foote, R. L., J. R. Molina, J. L. Kasperbauer, R. V. Lloyd, B. McIver, J. C. Morris, C. S. Grant, G. B. Thompson, M. L. Richards, I. D. Hay, R. C. Smallridge e K. C. Bible.2011. Enhanced survival in locoregionally confined anaplastic thyroid carcinoma: a single-institution experience using aggressive multimodal therapy. *Thyroid* 21(1): 25-30.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta e M. Gonzalez-Baron.2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30(2): 193-204.
- Galy, O., I. Chemin, E. Le Roux, S. Villar, F. Le Calvez-Kelm, M. Lereau, D. Gouas, B. Vieco, I. Suarez, M. C. Navas, M. Chevallier, H. Norder, P. Srivatanakul, A. Karalak, S. Sangrajang, C. Trepo e P. Hainaut.2011. Mutations in TP53 and CTNNB1 in Relation to Hepatitis B and C Infections in Hepatocellular Carcinomas from Thailand. *Hepat Res Treat* 2011: 697162.
- Garcia-Rostan, G., R. L. Camp, A. Herrero, M. L. Carcangiu, D. L. Rimm e G. Tallini.2001. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 158(3): 987-996.
- Garcia-Rostan, G., A. M. Costa, I. Pereira-Castro, G. Salvatore, R. Hernandez, M. J. Hermsem, A. Herrero, A. Fusco, J. Cameselle-Teijeiro e M. Santoro.2005. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 65(22): 10199-10207.
- Garcia-Rostan, G., G. Tallini, A. Herrero, T. G. D'Aquila, M. L. Carcangiu e D. L. Rimm.1999. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 59(8): 1811-1815.
- Garcia-Rostan, G., H. Zhao, R. L. Camp, M. Pollan, A. Herrero, J. Pardo, R. Wu, M. L. Carcangiu, J. Costa e G. Tallini.2003. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol* 21(17): 3226-3235.
- Gauchotte, G., C. Philippe, S. Lacomme, B. Leotard, M. P. Wissler, L. Allou, B. Toussaint, M. Klein, J. M. Vignaud e A. Bressenot.2011. BRAF, p53 and SOX2 in anaplastic thyroid carcinoma: evidence for multistep carcinogenesis. *Pathology* 43(5): 447-452.

- Georgitsi, M.2010. MEN-4 and other multiple endocrine neoplasias due to cyclin-dependent kinase inhibitors (p27(Kip1) and p18(INK4C)) mutations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24(3): 425-437.
- Goh, H. S., J. Yao e D. R. Smith.1995. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 55(22): 5217-5221.
- Gregory, P. A., A. G. Bert, E. L. Paterson, S. C. Barry, A. Tsykin, G. Farshid, M. A. Vadas, Y. Khew-Goodall e G. J. Goodall.2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10(5): 593-601.
- Hanahan, D. e R. A. Weinberg.2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. e R. A. Weinberg.2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Hay, E. D.2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 233(3): 706-720.
- Hendriksen, J., M. Jansen, C. M. Brown, H. van der Velde, M. van Ham, N. Galjart, G. J. Offerhaus, F. Fagotto e M. Fornerod.2008. Plasma membrane recruitment of dephosphorylated beta-catenin upon activation of the Wnt pathway. *J Cell Sci* 121(Pt 11): 1793-1802.
- Ho, Y. S., S. C. Tseng, T. Y. Chin, L. L. Hsieh e J. D. Lin.1996. p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 103(1): 57-63.
- Hou, P., D. Liu, Y. Shan, S. Hu, K. Studeman, S. Condouris, Y. Wang, A. Trink, A. K. El-Naggar, G. Tallini, V. Vasko e M. Xing.2007. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 13(4): 1161-1170.
- Ikenoue, T., F. Kanai, Y. Hikiba, T. Obata, Y. Tanaka, J. Imamura, M. Ohta, A. Jazag, B. Guleng, K. Tateishi, Y. Asaoka, M. Matsumura, T. Kawabe e M. Omata.2005. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 65(11): 4562-4567.
- Ikushima, H. e K. Miyazono.2010. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 10(6): 415-424.
- Imyanitov, E. N., M. Y. Grigoriev, V. M. Gorodinskaya, E. S. Kuligina, K. M. Pozharisski, A. V. Togo e K. P. Hanson.2001. Partial restoration of degraded DNA from archival paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 31(5): 1000, 1002.
- Ito, T., T. Seyama, T. Mizuno, N. Tsuyama, T. Hayashi, Y. Hayashi, K. Dohi, N. Nakamura e M. Akiyama.1992. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 52(5): 1369-1371.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward e D. Forman.2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90.
- Jin, L. H., Q. J. Shao, W. Luo, Z. Y. Ye, Q. Li e S. C. Lin.2003. Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers. *Int J Cancer* 107(5): 696-699.
- Jones, C. J., J. J. Shaw, F. S. Wyllie, N. Gaillard, M. Schlumberger e D. Wynford-Thomas.1996. High frequency deletion of the tumour suppressor gene P16INK4a (MTS1) in human thyroid cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 116(1): 115-119.
- Jones, P. A.1996. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 56(11): 2463-2467.
- Kapiteijn, E., T. C. Schneider, H. Morreau, H. Gelderblom, J. W. Nortier e J. W. Smit.2012. New treatment modalities in advanced thyroid cancer. *Ann Oncol* 23(1): 10-18.
- Kashkin, K. N., S. V. Khlgatian, O. V. Gurova, D. V. Kuprash e S. A. Nedospasov.2007. New mutations in the human p53 gene--a regulator of the cell cycle and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 72(3): 282-292.
- Kirsch, M., M. Morz, T. Pinzer, H. K. Schackert e G. Schackert.2009. Frequent loss of the CDKN2C (p18INK4c) gene product in pituitary adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 48(2): 143-154.
- Knudson, A. G., Jr.1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4): 820-823.
- Kondo, T., S. Ezzat e S. L. Asa.2006. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6(4): 292-306.
- Kroll, T. G., P. Sarraf, L. Pecciarini, C. J. Chen, E. Mueller, B. M. Spiegelman e J. A. Fletcher.2000. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289(5483): 1357-1360.
- Kurihara, T., S. Ikeda, Y. Ishizaki, M. Fujimori, N. Tokumoto, Y. Hirata, S. Ozaki, M. Okajima, K. Sugino e T. Asahara.2004. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid* 14(12): 1020-1029.
- Landa, I., C. Montero-Conde, D. Malanga, S. De Gisi, G. Pita, L. J. Leandro-Garcia, L. Inglada-Perez, R. Leton, C. De Marco, C. Rodriguez-Antona, G. Viglietto e M. Robledo.2010. Allelic variant at

- 79 (C>T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocr Relat Cancer* 17(2): 317-328.
- Lapointe, J., Y. Lachance, Y. Labrie e C. Labrie.1996. A p18 mutant defective in CDK6 binding in human breast cancer cells. *Cancer Res* 56(20): 4586-4589.
- Lawrence, M. C., A. Jivan, C. Shao, L. Duan, D. Goad, E. Zaganjor, J. Osborne, K. McGlynn, S. Stippec, S. Earnest, W. Chen e M. H. Cobb.2008. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res* 18(4): 436-442.
- Lee, J. J., A. Y. Au, T. Foukakis, M. Barbaro, N. Kiss, R. Clifton-Bligh, J. Staaf, A. Borg, L. Delbridge, B. G. Robinson, G. Wallin, A. Hoog e C. Larsson.2008. Array-CGH identifies cyclin D1 and UBCH10 amplicons in anaplastic thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 15(3): 801-815.
- Legakis, I. e K. Syrigos.2011. Recent advances in molecular diagnosis of thyroid cancer. *J Thyroid Res* 2011: 384213.
- Li, C. M., C. E. Kim, A. A. Margolin, M. Guo, J. Zhu, J. M. Mason, T. W. Hensle, V. V. Murty, P. E. Grundy, E. R. Fearon, V. D'Agati, J. D. Licht e B. Tycko.2004. CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. *Am J Pathol* 165(6): 1943-1953.
- Li, V. S., S. S. Ng, P. J. Boersema, T. Y. Low, W. R. Karthaus, J. P. Gerlach, S. Mohammed, A. J. Heck, M. M. Maurice, T. Mahmoudi e H. Clevers.2012. Wnt Signaling through Inhibition of beta-Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell* 149(6): 1245-1256.
- Liu, J. e R. E. Brown.2010. Immunohistochemical detection of epithelialmesenchymal transition associated with stemness phenotype in anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 3(8): 755-762.
- Liu, Z., P. Hou, M. Ji, H. Guan, K. Studeman, K. Jensen, V. Vasko, A. K. El-Naggar e M. Xing.2008. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 93(8): 3106-3116.
- Lloyd, R. V., D. Buehler e E. Khanafshar.2011. Papillary thyroid carcinoma variants. *Head Neck Pathol* 5(1): 51-56.
- Luchtenborg, M., M. P. Weijenberg, P. A. Wark, A. M. Saritas, G. M. Roemen, G. N. van Muijen, A. P. de Bruine, P. A. van den Brandt e A. F. de Goeij.2005. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* 5: 160.
- MacDonald, B. T., K. Tamai e X. He.2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17(1): 9-26.
- Malumbres, M. e M. Barbacid.2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1(3): 222-231.
- Manenti, G., S. Pilotti, F. C. Re, G. Della Porta e M. A. Pierotti.1994. Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer* 30A(7): 987-993.
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang e R. A. Weinberg.2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4): 704-715.
- Marinoni, I. e N. S. Pellegata.2011. p27kip1: a new multiple endocrine neoplasia gene? *Neuroendocrinology* 93(1): 19-28.
- Massague, J.2008. TGFbeta in Cancer. *Cell* 134(2): 215-230.
- Meulmeester, E. e P. Ten Dijke.2011. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol* 223(2): 205-218.
- Miller, J. R., A. M. Hocking, J. D. Brown e R. T. Moon.1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways. *Oncogene* 18(55): 7860-7872.
- Molatore, S., I. Marinoni, M. Lee, E. Pulz, M. R. Ambrosio, E. C. degli Uberti, M. C. Zatelli e N. S. Pellegata.2010. A novel germline CDKN1B mutation causing multiple endocrine tumors: clinical, genetic and functional characterization. *Hum Mutat* 31(11): E1825-1835.
- Montero-Conde, C., J. M. Martin-Campos, E. Lerma, G. Gimenez, J. L. Martinez-Guitarte, N. Combalia, D. Montaner, X. Matias-Guiu, J. Dopazo, A. de Leiva, M. Robledo e D. Mauricio.2008. Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information. *Oncogene* 27(11): 1554-1561.
- Moura, M. M., B. M. Cavaco, A. E. Pinto e V. Leite.2011. High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 96(5): E863-868.

- Muro-Cacho, C. A. e N. N. Ku.2000. Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features--part 1. *Cancer Control* 7(3): 276-287.
- Nikiforov, Y. E.2011. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol* 24 Suppl 2: S34-43.
- Nucera, C., A. Porrello, Z. A. Antonello, M. Mekel, M. A. Nehs, T. J. Giordano, D. Gerald, L. E. Benjamin, C. Priolo, E. Puxeddu, S. Finn, B. Jarzab, R. A. Hodin, A. Pontecorvi, V. Nose, J. Lawler e S. Parangi.2010. B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(23): 10649-10654.
- Onda, M., M. Emi, A. Yoshida, S. Miyamoto, J. Akaishi, S. Asaka, K. Mizutani, K. Shimizu, M. Nagahama, K. Ito, T. Tanaka e T. Tsunoda.2004. Comprehensive gene expression profiling of anaplastic thyroid cancers with cDNA microarray of 25 344 genes. *Endocr Relat Cancer* 11(4): 843-854.
- Ozaki, T. e A. Nakagawara.2011. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol* 2011: 603925.
- Ozenne, P., B. Eymin, E. Brambilla e S. Gazzeri.2010. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer* 127(10): 2239-2247.
- Pallante, P., M. T. Berlingieri, G. Troncone, M. Kruhoffer, T. F. Orntoft, G. Viglietto, A. Caleo, I. Migliaccio, M. Decaussin-Petrucci, M. Santoro, L. Palombini e A. Fusco.2005. UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 93(4): 464-471.
- Park, M. T. e S. J. Lee.2003. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 36(1): 60-65.
- Parkin, D. M.2001. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2(9): 533-543.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay e P. Pisani.2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2): 74-108.
- Pasquali, D., L. Circelli, A. Faggiano, M. Pancione, A. Renzullo, R. Elisei, C. Romei, G. Accardo, V. R. Coppola, M. De Palma, P. Ferolla, F. Grimaldi, A. Colao e V. Colantuoni.2011. CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 164(3): 397-404.
- Pita, J. M., A. Banito, B. M. Cavaco e V. Leite.2009. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 101(10): 1782-1791.
- Poremba, C., D. W. Yandell, D. Metze, D. Kamanabrou, W. Bocker e B. Dockhorn-Dworniczak.1995. Immunohistochemical detection of p53 in melanomas with rare p53 gene mutations is associated with mdm-2 overexpression. *Oncol Res* 7(7-8): 331-339.
- Powell, B., R. Soong, B. Iacopetta, R. Seshadri e D. R. Smith.2000. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 6(2): 443-451.
- Quiros, R. M., H. G. Ding, P. Gattuso, R. A. Prinz e X. Xu.2005. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 103(11): 2261-2268.
- Radisky, D. C.2005. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 118(Pt 19): 4325-4326.
- Ricarte-Filho, J. C., M. Ryder, D. A. Chitale, M. Rivera, A. Heguy, M. Ladanyi, M. Janakiraman, D. Solit, J. A. Knauf, R. M. Tuttle, R. A. Ghossein e J. A. Fagin.2009. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 69(11): 4885-4893.
- Rocha, A. S., P. Soares, E. Fonseca, J. Cameselle-Teijeiro, M. C. Oliveira e M. Sobrinho-Simoes.2003. E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology* 42(6): 580-587.
- Rusinek, D., S. Szpak-Ulczo e B. Jarzab.2011. Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status. *J Mol Endocrinol* 47(3): R91-103.
- Sadow, P. M. e W. C. Faquin.2012. Poorly differentiated thyroid carcinoma: an incubating entity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 77.
- Salk, J. J., E. J. Fox e L. A. Loeb.2010. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol* 5: 51-75.
- Salvatore, G., T. C. Nappi, P. Salerno, Y. Jiang, C. Garbi, C. Ugolini, P. Miccoli, F. Basolo, M. D. Castellone, A. M. Cirafici, R. M. Melillo, A. Fusco, M. L. Bittner e M. Santoro.2007. A cell proliferation and chromosomal instability signature in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 67(21): 10148-10158.
- Sambrook, J. e D. W. Russell.2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein e V. E. Velculescu.2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304(5670): 554.
- Sanger, F., S. Nicklen e A. R. Coulson.1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Santarpia, L., A. K. El-Naggar, G. J. Cote, J. N. Myers e S. I. Sherman.2008. Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 93(1): 278-284.
- Sastre-Perona, A. e P. Santisteban.2012. Role of the wnt pathway in thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 31.
- Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, M. Schuelke e D. Seelow.2010. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 7(8): 575-576.
- Selivanova, G.2010. Therapeutic targeting of p53 by small molecules. *Semin Cancer Biol* 20(1): 46-56.
- Sherr, C. J.2000. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 96: 73-92.
- Shi, J., D. Yao, W. Liu, N. Wang, H. Lv, G. Zhang, M. Ji, L. Xu, N. He, B. Shi e P. Hou.2012. Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC Cancer* 12: 50.
- Smallridge, R. C. e J. A. Copland.2010. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22(6): 486-497.
- Smallridge, R. C., L. A. Marlow e J. A. Copland.2009. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer* 16(1): 17-44.
- Soares, P., J. Lima, A. Preto, P. Castro, J. Vinagre, R. Celestino, J. P. Couto, H. Prazeres, C. Eloy, V. Maximo e M. Sobrinho-Simoes.2011. Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Curr Genomics* 12(8): 609-617.
- Soong, R., B. Powell, H. Elsaleh, G. Gnanasampanthan, D. R. Smith, H. S. Goh, D. Joseph e B. Iacopetta.2000. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer* 36(16): 2053-2060.
- Stott, F. J., S. Bates, M. C. James, B. B. McConnell, M. Starborg, S. Brookes, I. Palmero, K. Ryan, E. Hara, K. H. Vousden e G. Peters.1998. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17(17): 5001-5014.
- Su, X., D. Chakravarti, M. S. Cho, L. Liu, Y. J. Gi, Y. L. Lin, M. L. Leung, A. El-Naggar, C. J. Creighton, M. B. Suraokar, I. Wistuba e E. R. Flores.2010. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* 467(7318): 986-990.
- Swaak-Kragten, A. T., J. H. de Wilt, P. I. Schmitz, M. Bontenbal e P. C. Levendag.2009. Multimodality treatment for anaplastic thyroid carcinoma--treatment outcome in 75 patients. *Radiother Oncol* 92(1): 100-104.
- Taccaliti, A., F. Silveti, G. Palmonella e M. Boscaro.2012. Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 84.
- Takano, T., Y. Ito, M. Hirokawa, H. Yoshida e A. Miyauchi.2007. BRAF V600E mutation in anaplastic thyroid carcinomas and their accompanying differentiated carcinomas. *Br J Cancer* 96(10): 1549-1553.
- Taniguchi, K., L. R. Roberts, I. N. Aderca, X. Dong, C. Qian, L. M. Murphy, D. M. Nagorney, L. J. Burgart, P. C. Roche, D. I. Smith, J. A. Ross e W. Liu.2002. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 21(31): 4863-4871.
- Thiery, J. P.2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2(6): 442-454.
- Tie, J., P. Gibbs, L. Lipton, M. Christie, R. N. Jorissen, A. W. Burgess, M. Croxford, I. Jones, R. Langland, S. Kosmider, D. McKay, G. Bollag, K. Nolop, O. M. Sieber e J. Desai.2011. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer* 128(9): 2075-2084.
- Toledo, F. e G. M. Wahl.2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6(12): 909-923.
- Troch, M., O. Koperek, C. Scheuba, K. Dieckmann, M. Hoffmann, B. Niederle e M. Raderer.2010. High efficacy of concomitant treatment of undifferentiated (anaplastic) thyroid cancer with radiation and docetaxel. *J Clin Endocrinol Metab* 95(9): E54-57.

- Tung, W. S., D. W. Shevlin, D. Bartsch, J. A. Norton, S. A. Wells, Jr. e P. J. Goodfellow.1996. Infrequent CDKN2 mutation in human differentiated thyroid cancers. *Mol Carcinog* 15(1): 5-10.
- van Oijen, M. G., M. G. Tilanus, R. H. Medema e P. J. Slootweg.1998. Expression of p21 (Waf1/Cip1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Pathol Med* 27(8): 367-375.
- van Veelen, W., R. Klompmaker, M. Gloerich, C. J. van Gasteren, E. Kalkhoven, R. Berger, C. J. Lips, R. H. Medema, J. W. Hoppener e D. S. Acton.2009. P18 is a tumor suppressor gene involved in human medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma development. *Int J Cancer* 124(2): 339-345.
- van Veelen, W., C. J. van Gasteren, D. S. Acton, D. S. Franklin, R. Berger, C. J. Lips e J. W. Hoppener.2008. Synergistic effect of oncogenic RET and loss of p18 on medullary thyroid carcinoma development. *Cancer Res* 68(5): 1329-1337.
- Voet, D., J. G. Voet e P. C. W.1999. *Fundamentals of Biochemistry*. Nova Iorque, John Wiley and Sons.
- Vrbic, S., I. Pejicic, M. Vrbic e S. Filipovic.2009. Therapy of stage IV B anaplastic thyroid carcinoma: single institution experience. *J BUON* 14(1): 41-44.
- Wang, H. M., Y. W. Huang, J. S. Huang, C. H. Wang, V. C. Kok, C. M. Hung, H. M. Chen e C. Y. Tzen.2007. Anaplastic carcinoma of the thyroid arising more often from follicular carcinoma than papillary carcinoma. *Ann Surg Oncol* 14(10): 3011-3018.
- Weinberg, R. A.1994. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin* 44(3): 160-170.
- Weinberg, R. A.1996. How cancer arises. *Sci Am* 275(3): 62-70.
- Willis, A., E. J. Jung, T. Wakefield e X. Chen.2004. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23(13): 2330-2338.
- Wiseman, S. M., O. L. Griffith, S. Deen, A. Rajput, H. Masoudi, B. Gilks, L. Goldstein, A. Gown e S. J. Jones.2007. Identification of molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic thyroid carcinoma. *Arch Surg* 142(8): 717-727; discussion 727-719.
- Wu, G., E. Mambo, Z. Guo, S. Hu, X. Huang, S. M. Gollin, B. Trink, P. W. Ladenson, D. Sidransky e M. Xing.2005. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90(8): 4688-4693.
- Xing, M.2005. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12(2): 245-262.
- Xing, M.2010. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 20(7): 697-706.
- Yardy, G. W., D. C. Bicknell, J. L. Wilding, S. Bartlett, Y. Liu, B. Winney, G. D. Turner, S. F. Brewster e W. F. Bodmer.2009. Mutations in the AXIN1 gene in advanced prostate cancer. *Eur Urol* 56(3): 486-494.
- Yau, T., C. Y. Lo, R. J. Epstein, A. K. Lam, K. Y. Wan e B. H. Lang.2008. Treatment outcomes in anaplastic thyroid carcinoma: survival improvement in young patients with localized disease treated by combination of surgery and radiotherapy. *Ann Surg Oncol* 15(9): 2500-2505.
- Zariwala, M., E. Liu e Y. Xiong.1996. Mutational analysis of the p16 family cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4b and p18INK4c in tumor-derived cell lines and primary tumors. *Oncogene* 12(2): 451-455.
- Zhao, L. e P. K. Vogt.2008. Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7): 2652-2657.
- Zhou, B. P., J. Deng, W. Xia, J. Xu, Y. M. Li, M. Gunduz e M. C. Hung.2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6(10): 931-940.
- Zou, M., Y. Shi e N. R. Farid.1993. p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 77(4): 1054-1058.

VI. Anexos

Anexo I – Primers e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados

Tabela I – Primers e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
BRAF	15	BRAF-15F	AAACTCTTCATAATGCTTGCTCTG	231	1,5	58
		BRAF-15R	GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA			
N-RAS	2	NRAS-2F	GGTTTCCAACAGGTTCTTGC	145	1,8	60
		NRAS-2R	CTCACCTCTATGGTGGGATCA			
	3	NRAS-3F	CACCCCCAGGATTCTTACAG	148	1,8	60
		NRAS-3R	TGGCAAATACACAGAGGAAGC			
H-RAS	1	HRAS-1F	CAGGAGACCCTGTAGGAGGA	148	1,8	60
		HRAS-1polR	GGGTCGTATTCGTCCACAA			
	2	HRAS-2F	GATTCCTACCGGAAGCAGGT	140	1,8	60
		HRAS-2R	ATGGCAAACACACACAGGAA			
K-RAS	2	KRAS-2F	TTAACCTTATGTGTGACATGTTCTAAT	175	1,8	60
		KRAS-2R	TTGTTGGATCATATTCGTCCAC			
	3	KRAS-3intF	TCAAGTCCTTTGCCCATTTT	376	1,8	60
		KRAS-3intR	ATGCATGGCATTAGCAAAGA			
TP53	5	TP53-5F	GCCGTCTTCCAGTTGCTTTAT	331	1,5	58
		TP53-5R	GCAATCAGTGAGGAATCAGAGG			
	6	TP53-6F	GAGAGACGACAGGGCTGGTT	240	1,5	58
		TP53-6R	CTGGAGGGCCACTGACAAC			
	7	TP53-7bF	TGCTTGCCACAGGTCTCC	236	1,5	58
		TP53-7R	GGTCAGAGGCAAGCAGAGG			
	8	TP53-8F	GGAGTAGATGGAGCCTGGTTT	288	1,7	58
		TP53-8R	AGTGAATCTGAGGCATAACTGC			
	9	TP53-9F	TAAGCAAGCAGGACAAGAAGC	240	1,5	58
		TP53-9R	CAGTCAAGAAGAAAACGGCATT			
PIK3CA	1	PIK3CA1F	AGAATCAGAACAATGCCTCCA	254	1,5	57
		PIK3CA1R	TCTTCCCTTTCTGCTTCTTGA			
	9	PIK3CA9AF	TATTGAAAATGTATTTGCTTTTTTC	237	1,8	57
		PIK3CA9AR	ATTTTAGCACTTACCTGTGAC			
	20	PIK20GF	GCAAAGACCTGAAGGTATTAACAT	205	1,5	57
		PIK20GR	GGGTCTTTCGAATGTATGCAA			
		PIK3CA20BF	ATGATGCTTGGCTCTGGAAT	273	1,5	57
		PIK3CA20BR	GGTCTTTGCCTGCTGAGAGT			
CTNNB1	3	BCAT-3F	GATTTGATGGAGTTGGACATGG	218	1,2	59,5
		BCAT-3R	TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG			
AXIN1	1	AXIN1-1aF	AGATTGATTCACCTTTGGAGCTG	241	1,6	58
		AXIN1-1aR	CACCTTTAATGCCAACACCTT			
		AXIN1-1bF	CGCCAGCTACAGTTTCTGCT	243	1,6	58
		AXIN1-1bR	GCAAACCAGAAGTCCAGCAA			

Tabela I – Primers e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados (continuação)

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
AXIN1	1	AXIN1-1cF	CGACTTGCTGGACTTCTGGT	217	1,6	58
		AXIN1-1cR	CTGGTCAAACATGGCAGGAT			
		AXIN1-1dF	CTGATCGATCCTGCCATGTT	236	1,6	58
		AXIN1-1dR	TCCATGTCCTGGTCACACTTC			
		AXIN1-1eF	GAGGAATGGAAGTGTGACCAG	193	1,6	58
		AXIN1-1eR	GCTCTCGGAGGTGAGTACAGA			
	2	AXIN1-2F	CTGTTGGCAGGCTGTCACT	221	1,6 ¹	58
		AXIN1-2R	TCCGTGAGGGACTGGGTAT			
	3	AXIN1-3F	CTGAGTTAACGGCTGCCTCT	150	1,6	58
		AXIN1-3R	ACCGCAAAGCCGGTACTTA			
	4	AXIN1-4F	TTAGCCTGTGACCTTTCAACC	242	1,6	58
		AXIN1-4R	CAAGAAAAACAGCACGACACC			
	5	AXIN1-5aF	AGAGGTGATGGTGCTGCTTG	220	1,6	58
		AXIN1-5aR	TGTCCTCAGCACACGCTGTA			
		AXIN1-5bF	CACGAGGAGAACCCTGAGAG	230	1,2	61
		AXIN1-5bR	ACGTGGTGGTGGACGTGT			
		AXIN1-5cF	CTGCACCACCACCGACAC	255	1,2	61
		AXIN1-5cR	TCCTCACTGACAGGCGCA			
	6	AXIN1-6aF	AGACGAGGAAGGGGCACAG	218	1,2	61
		AXIN1-6aR	GCCTGCTGATCTCCTTTTCC			
		AXIN1-6bF	CATGCAGTGGATCATTGAGG	158	1,6	58
		AXIN1-6bR	ACTCGCCACACACACTGAAG			
	7	AXIN1-7aF	GCTGCCCTTGTGAGATGAG	216	1,6	58
		AXIN1-7aR	ATGGTGGGGTCTTGATGA			
		AXIN1-7bF	CTCCCACCTCTTCATCCAAG	189	1,6 ¹	58
		AXIN1-7bR	CAGGAGTGGTGCTGTGGTAA			
	8	AXIN1-8F	CTTTGACGCGGGTTGTTC	204	1,6	58
		AXIN1-8R	CTACGATGGGACCTGGCTTG			
	9	AXIN1-9F	GTACCACCGCTGCATCTCTT	246	1,6	58
		AXIN1-9R	GGGCACCCACATACTCGT			
	10	AXIN1-10aF	GGTCATTGCACTGTTCACTGTT	239	1,6	58
		AXIN1-10aR	TCCTCTCGAACCTCCTCAAA			
		AXIN1-10bF	GAGTTTGACTGTGGGGTGGT	190	1,6	58
		AXIN1-10bR	GGCTCCTGAGTACGAGGTCA			
CDKN2A	p14-1	P14ARF-1F	GCGCGCTCAGGGAAGG	444	1,8	57
		P14ARF-1R	GGGCTAGAGACGAATTATCTGTTTACGA			
	p16-1	P16-1F	AGGAGCCCAGTCCTCCTTC	488	1,8	57
		P16-1R	GGCCTCCGACCGTAACCTATT			
		P16-2F	GGGTCGGGTAGAGGAGGTG	439	1,8	57
		P16-2R	TCCCAGCACATCTTACATTCTT			

Tabela I – *Primers* e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados (continuação)

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
CDKN2A	p14/p 16-2	P14-P16-3F	GTGAGGGGGCTCTACACAAG	468	1,8	57
		P14-P16-3R	GCTGAACCTTTCTGTGCTGGAA			
	p16-3	P16-4F	GCCCATACGCAACGAGATTAG	384	1,8	57
		P16-4R	GCTCAAGCGCTCCAGGTC			
	p14/p 16-3	P14-P16-5F	GAGAGGAGGGCGGGATGT	396	1,3	58
		P14-P16-5R	ACATGAATGTGCGCTTAGGG			
CDKN2B	1	P15-1F	TGGGAAAAGAAGGGAAGAGTGT	468	1,5	58
		P15-1R	GAGATGGCAGAACAAAAACCA			
	2	P15-2F	CGGCATCTCCCATACCTG	437	1,5	58
		P15-2R	CTTGCAGGCTTACAGGCTTT			
CDKN2C	3	P18-1F-1R	TCCTTCTGTCACTCTCCGATG	300	1,3	58
			TAGAAACCCGGGTCACGTAG			
	4	P18-2F-2R	TGCACTTGAAGGATTCTACCAT	452	1,3	58
			TAAAGTAGAGGCAACGTGGG			
CDKN1A	1	P21-1F	TGCTGCATGATCTGAGTTAGG	239	1,3	59
		P21-1R	AAAAGGGCAACCTGATCTCC			
	2	P21-2aF	CGGCCAGGTAACATAGTGTC	309	1,3	59
		P21-2aR	CGTGGGAAGGTAGAGCTTG			
		P21-2bF	CACCACTGGAGGGTGACTTC	340	1,4	60,5
		P21-2bR	CCTTGGACCATGGATTCTGAG			
	3	P21-3F	CCCCACTGTCTTCCTCAGTT	193	1,6	58
		P21-3R	AAGATGTAGAGCGGGCCTTT			
CDKN1B	1	P27-1aF	CCATTTGATCAGCGGAGACT	459	1,2	58
		P27-1aR	CACCTCTTGCCACTCGTACTT			
		P27-1bF	CGGTGGACCACGAAGAGTTA	441	1,2	58
		P27-1bR	AAGGTTAACACCCTCCAG			
	2	P27-2F	TGACTATGGGGCCAATTCT	297	1,2	58
		P27-2R	ATTTGCCAGCAACCAGTAAGA			

¹Adicionou-se 6% de DMSO à reacção. Tam. – Tamanho do segmento a amplificar; T_a – Temperatura de *annealing*.

Anexo II – Primers e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados – amplicons de menor tamanho

Tabela II – Primers e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados – amplicons de menor tamanho

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
TP53	5	TP53-5F	GCCGTCTTCCAGTTGCTTTAT	205	1,8	56
		TP53-5AR	TCATGTGCTGTGACTGCTTGT			
		TP53-5BF	CAGCTGTGGGTTGATTCCA	205	1,8	56
		TP53-5R	GCAATCAGTGAGGAATCAGAGG			
	8	TP53-8AF	TGCTTCTCTTTTCCTATCCTGA	226	1,8	56
		TP53-8R	AGTGAATCTGAGGCATAACTGC			
CDKN1A	2	P21-2dF	GCGACTGTGATGCGCTAAT	240	1,2	58
		P21-2dR	CCACATGGTCTTCTCTGCT			
		P21-2eF	CTGGCACCTCACCTGCTCT	226	1,2	60
		P21-2bR	CCTTGGACCATGGATTCTGAG			
CDKN2B	1	P15-1F	TGGGAAAGAAGGGAAGAGTGT	218	1,5	59
		P15-1AR	GAAACGGTTGACTCCGTTG			
		P15-1BF	TAGTGGAGAAGGTGCGACAG	196	1,5	59
		P15-1BR	CAACGGAGACTCCTGTACAAAT			
	2	P15-2F	CGGCATCTCCCATACCTG	191	1,5	59
		P15-2AR	ACCAGCGTGTCAGGAAG			
		P15-2BF	AGACCTGCCACTCTCACC	173	1,5 ¹	59
		P15-2BR	GCAGGTACCCTGCAACGTC			
		P15-2CF	CTTCCTGGACACGCTGGT	201	1,5	59
		P15-2CR	GGGTGGGAAATTGGGTAAGA			
CDKN2A	p14-1	P14ARF-1F	GCGCGCTCAGGGAAGG	196	1,2 ¹	58-60
		P14ARF-1AR	AATCCGGAGGGTCACCAAG			
		P14ARF-2F	GCGCAGGTTCTTGGTGAC	200	1,2 ¹	58-60
		P14ARF-2R	GGCCTTTCCTACCTGGTCTT			
		P14ARF-3F	GCCCTCGTGCTGATGCTACT	152	1,2 ¹	58-60
		P14ARF-3R	GGGCTAGAGACGAATTATCTGTTTACGA			
CDKN2A	p16-1	P16-1F	AGGAGCCCAGTCTCCTTC	212	1,2	58-60
		P16-1AR	ACCCTGTCCCTCAAATCCTC			
		P16-1BF	CCCCTTGCCTGGAAAGATAC	228	1,2	58-60
		P16-1BR	GTCAGCCGAAGGCTCCAT			
		P16-1CF	ATGGAGCCTTCGGCTGAC	119	1,2	58-60
		P16-1CR	GGCCTCCGACCGTAACCTATT			
	p14/ p16-2	P16-2F	GGGTCGGGTAGAGGAGGTG	181	1,2	58-60
		P16-2AR	GAGAATCGAAGCGCTACCTG			
		P16-P14-3F	GTGAGGGGGCTCTACACAAG	213	1,2	58-60
		P16-P14-3AR	ACCAGCGTGTCAGGAAG			
		P16-P14-3BF	GGAGGGCTTCTGGACAC	170	1,2	58-60
		P16-P14-3BR	GGGCATGGTTACTGCCTCT			
		P16-P14-3CF	GACCTGGCTGAGGAGCTG	194	1,2	58-60
		P16-P14-3R	GCTGAACTTCTGTGCTGGAA			

Tabela II – *Primers* e condições utilizadas para amplificação por PCR dos genes estudados – *amplicons* de menor tamanho (continuação)

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
CDKN2A	p14/ p16-2	P16-P14-5F	GAGAGGAGGGCGGGATGT	161	1,2	58-60
		P16-P14-5AR	TTGTGGCCCTGTAGGACCTT			
		P16-P14-5BF	CCCGATTGAAAGAACCAGAG	187	1,2	58-60
		P16-P14-5BR	GGTAGTGGGGGAAGGCATA			
		P16-P14-5CF	ATATGCCTTCCCCCACTACC	150	1,2	58-60
		P16-P14-5CR	ACATGAATGTGCGCTTAGGG			
PIK3CA	1	PIK3CA-1F	AGAATCAGAACAATGCCTCCA	175	1,8	58
		PIK3CA-1AR	TTCTTGCTTCTTTAAATAGTTCATGC			
		PIK3CA-1AF	GACTTTAGAATGCCTCCGTGA	147	1,8	58
		PIK3CA-1R	TCTTCCCTTTCTGCTTCTTGA			
	20	PIK3CA-20BF	ATGATGCTTGGCTCTGGAAT	232	1,8	58
		PIK3CA-20AR	TCCAGAGTGAGCTTTCATTTTC			

¹ Adicionou-se 6% de DMSO à reacção. Tam. – Tamanho do segmento a amplificar; T_a – Temperatura de *annealing*.

Anexo III – *Primers* e condições utilizadas para amplificação por RT-PCR dos genes estudados

Tabela III – *Primers* e condições utilizadas para amplificação por RT-PCR dos genes estudados

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
N-RAS	2 e 3	NRAS-F	TGCTGGTGTGAAATGACTGA	239	1,6	57
		NRAS-R	TCGCCTGTCCTCATGTATTG			
H-RAS	1 e 2	HRAS-F	CGGAATATAAGCTGGTGGT	247	1,4 ¹	59
		HRAS-R	ATGGCAAACACACACAGGA			
K-RAS	2 e 3	KRAS-F	GCCTGCTGAAAATGACTGAA	249	1,4	57
		KRAS-R	AAAGAAAGCCCTCCCCAGT			
BRAF	15	BRAF-F	GCCAAGTCAATCATCCACAG	211	1,8	57
		BRAF-R	CATCTGACTGAAAGCTGTATGGA			
PIK3CA	1	PIK-1F	AGAATCAGAACAATGCCTCCA	250	1,8	58
		PIK-1R	TCTTCCCTTTCTGCTTCTTGA			
PIK3CA	1	PIK-1BF	GCAAGAAAATACCCCTCCA	274	1,5	58
		PIK-1BR	GAATATTCTTCGGAAGTCCTG			
	9	PIK-9F	TGATTGAAGAGCATGCCAAT	288	1,8	58
		PIK-9R	CCAAGCAATACATCTGGGCTA			
	20	PIK-20F	CGTGTGCCATTTGTTTTGAC	260	1,8	59
		PIK-20R	TCCAAAGCCTCTTGCTCAGT			
		PIK-20BF	ATGATGCTTGGCTCTGGAAT	273	1,2	60
		PIK-20BR	GGTCTTTTGCCTGCTGAGAGT			
TP53	5-7	TP53-AF	CATTCTGGGACAGCCAAGTC	389	1,8	58
		TP53-AR	CCCATGCAGGAAGTGTACAC			
TP53	6-9	TP53-BF	TAGTGTGGTGGTGCCTATG	381	1,8	56
		TP53-BR	AACATCTCGAAGCGCTCAC			

Tabela III – Primers e condições utilizadas para amplificação por RT-PCR dos genes estudados (continuação)

Gene	Exão	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tam. (bp)	[MgCl ₂] (mM)	T _a (°C)
CTNNB1	3	BCAT-3F	GATTTGATGGAGTTGGACATGG	218	1,2	59,5
		BCAT-3R	TGTTCTTGAGTGAAGGACTGAG			

¹Adicionou-se 2% de Formamida e BSA 1X à reacção. Tam. – Tamanho do segmento a amplificar; T_a – Temperatura de annealing.

Anexo IV – Amostras não estudadas

Tabela IV – Amostras não estudadas

Gene	Exão	Segmento	Amostra
<i>BRAF</i>	15	15F-15R	45
			46
<i>N-RAS</i>	2 e 3	2F-3R	42
<i>H-RAS</i>	1	1F-1polR	45
			46
<i>K-RAS</i>	2 e 3	2F-3R	14
			40
			45
	3	3intF-3intR	16
			19
			48
<i>TP53</i>	5-7	aF-aR	14
			45
	6	6F-6R	16
			20
	8	8aF-8R	20
			45
<i>CTNNB1</i>	3	3F-3R	16
			21
		2F-2aR	23
			45
			45
			46
<i>CDKN2B</i>	2	2bF-2bR	16
			17
			47
			18
			19
			20
		2cF-2cR	48
			21
			23
			49
			45
			17
<i>CDKN1A</i>	3	3F-3R	20
			48
			22
			43